



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

Eficacia del péptido TSOL18 expresado en *Pichia pastoris* como vacuna contra la cisticercosis porcina

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Julia Mónica MARTÍNEZ CONDORI

ASESOR

César Miguel GAVIDIA CHUCÁN

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Martinez J. Eficacia del péptido TSOL18 expresado en *Pichia pastoris* como vacuna contra la cisticercosis porcina [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2018.



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL
TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO**

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **martes 09 de octubre de 2018**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 0220-EPMV/FMV-2018, integrado por los siguientes profesores:

MV. Mg. **Hermelinda Rivera Gerónimo**
Dr. MPH. **César Gavidia Chucán**
MV. **Antonio Ampuero Bustillo**
MV. **Eva Consuelo Casas Astos**

Presidente del Jurado
Asesor de la Tesis
Miembro del Jurado
Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **MARTÍNEZ CONDORI, JULIA MÓNICA** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

“EFICACIA DEL PÉPTIDO TSOL18 EXPRESADO EN *Pichia pastoris* COMO VACUNA CONTRA LA CISTICERCOSIS PORCINA”

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECIOCHO (18)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:00 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

Hermelinda Rivera Gerónimo: Mg. Prof. Principal, D.E.

César Gavidia Chucán: Ph.D. Prof. Principal, D.E.

Antonio Ampuero Bustillo: MV. Prof. Asociado, D.E.

Eva Consuelo Casas Astos: MV. Asociado, T.C.

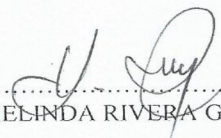




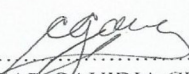
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA


Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 0220-EPMV/FMV-2018.

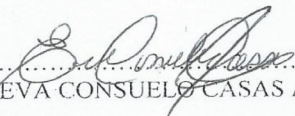
PRESIDENTE:


HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO

MIEMBROS :


CÉSAR GAVIDIA CHUCÁN
Asesor de la Tesis


ANTONIO AMPUERO BUSTILLO


EVA CONSUELO CASAS ASTOS

San Borja, 19 de octubre de 2018

V° B°

.....
Dra. Daphne Ramos Delgado
Directora
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria



DEDICATORIA

*A Dios por permitirme continuar y
terminar una de mis metas.*

*A mis padres: Epímaco y Mónica, y a mi
hermano Gustavo, por todo el apoyo
brindado durante mis años de estudio.*

*A mi hermana Natalia por ser el mejor
ejemplo a seguir, por confiar en mí de
manera incondicional y acompañarme
durante todos estos años de vida y
desarrollo profesional.*

*A mi mejor y eterna amiga Raquel, por
demostrarme con su ejemplo, que uno
nunca debe darse por vencido y que
cada problema es una oportunidad de
superarnos.*

*A mis amigos Daniel, Viviana y Mary
que me apoyaron con sus palabras de
aliento, regaños, y buenos consejos
durante mi época universitaria y
durante la realización de esta tesis.*

*A Aioria, porque al adoptarlo, me dio la
fuerza y el estímulo necesario para
continuar y culminar mis estudios.*

*A todas aquellas personas que Dios
puso en mi camino en diversas etapas de
mi vida, para acompañarme,
escucharme y aconsejarme.*

*A todos ustedes, muchas gracias por ayudarme a abrir más caminos en mi desarrollo
profesional y por la confianza brindada.*

AGRADECIMIENTO

A la MV. PhD Sofía Arriola y al MV. PhD. Armando González, por darme la oportunidad de realizar esta tesis.

Al MV. PhD César Gavidia por su paciencia, su amplia experiencia profesional y su apoyo durante todo el tiempo de elaboración de este manuscrito.

A todas aquellas personas que me apoyaron durante la realización de la fase experimental de este proyecto. Mi más profundo agradecimiento a Gianfranco, Juan Calcina, Beto, el Sr. Luis, Elton, Juan y Adrian.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	iii
TABLA DE CONTENIDO	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ANEXOS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 GENERALIDADES	3
2.2 TAXONOMÍA DEL PARÁSITO	4
2.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>Taenia solium</i>	5
2.3.1 Fase adulta	5
2.3.2 Fase larvaria	7
2.4 METABOLISMO DE <i>Taenia solium</i>	8
2.5 CICLO BIOLÓGICO	9
2.6 CISTICERCOSIS PORCINA	11
2.6.1 Epidemiología de la Cisticercosis Porcina	11
2.6.2 Cisticercosis Porcina en el Perú	14
2.6.3 Importancia de la Cisticercosis en Salud Pública	15
2.6.4 Impacto económico de la Cisticercosis Porcina	16
2.7 DIAGNÓSTICO DE LA CISTICERCOSIS PORCINA	17
2.7.1 Diagnóstico <i>ante-mortem</i>	17
2.7.2 Diagnóstico <i>post-mortem</i>	18
2.8 ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO Y CONTROL CONTRA LA CISTICERCOSIS PORCINA	19
2.8.1 Quimioterapia en porcinos	19
2.8.2 Identificación e intervención de factores de riesgo	20
2.8.3 Vacunación contra cisticercosis porcina	21
2.9 EVALUACIÓN DE LA ESTRATEGIA DE VACUNACIÓN PARA EL CONTROL DE LA CISTICERCOSIS PORCINA	22
2.9.1 Inmunología del cerdo	22
2.9.2 Respuesta inmune contra Cisticercosis porcina	23
2.9.3 Mecanismos de evasión inmunitaria por <i>Taenia solium</i>	24
2.9.4 Primeros ensayos de vacunación contra <i>Taenia solium</i>	26
2.9.5 Uso de la vacuna recombinante TSOL18 contra Cisticercosis Porcina	26

2.9.5.1	Estructura de la proteína recombinante	28
2.9.5.2	Adyuvantes	28
2.9.5.3	Perspectivas del uso de vacunas recombinantes contra la Cisticercosis Porcina.....	29
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1	LUGAR Y FECHA DE ESTUDIO.....	31
3.2	CONSIDERACIONES ÉTICAS	31
3.3	ANIMALES	32
3.4	TAMAÑO DE GRUPO EXPERIMENTAL.....	32
3.5	DISEÑO DE ESTUDIO.....	33
3.5.1	Tipo de estudio.....	33
3.5.2	Traslado de los cerdos a la granja experimental	33
3.5.3	Vacunas.....	34
3.5.4	Grupos de Tratamiento	34
3.5.5	Monitoreo serológico de los cerdos	36
3.5.6	ELISA Indirecto para detección de anticuerpos	37
3.5.7	Desafío de los cerdos con un proglotis grávido de <i>Taenia solium</i>	38
3.5.8	Traslado de cerdos a las instalaciones de la FMV-UNMSM.....	39
3.5.9	Eutanasia, necropsia de los cerdos y evaluación de la canal	39
3.6	ORGANIZACIÓN DE LOS RESULTADOS	41
3.7	ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	41
IV.	RESULTADOS	42
4.1	Carga parasitaria	42
4.2	Resultados de ELISA indirecto.....	44
V.	DISCUSIÓN	47
VI.	CONCLUSIONES	51
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
VIII.	ANEXOS	63

RESUMEN

La cisticercosis porcina es causada por el parásito *Taenia solium* y ocasiona un gran impacto económico y sanitario en zonas rurales de diferentes países del mundo. Se han evaluado diferentes estrategias de control de la cisticercosis para demostrar su efectividad en campo. El presente estudio evaluó la protección en cerdos mediante el uso de dos vacunas recombinantes desarrolladas con el péptido TSOL18 de *Taenia solium*, con dos tipos de adyuvantes y dos esquemas de vacunación controlados en un ensayo de infección experimental. Cuarenta y nueve cerdos de dos meses de edad fueron distribuidos en los siguientes tratamientos: ^{T1}Vacuna IILTSOL18+ISA206V; ^{T2}Vacuna UMTSOL18+QuilA; ^{T3}Vacuna IILTSOL18+QuilA; ^{T4}Vacuna IILTSOL18+ISA206V; ^{T5}Control. La vacunación se realizó al día 0 y al día 23 de estudio para los cerdos de T2, T3 y T4, mientras que los cerdos de T1 fueron únicamente vacunados al día 23. Se realizó el desafío oral con proglótidos de *Taenia solium* al día 37 de estudio y los cerdos fueron mantenidos 12 semanas adicionales bajo condiciones controladas. Se realizaron pruebas de ELISA indirecto en suero sanguíneo para la detección de anticuerpos anti-TSOL18, los cuales fueron interpretados mediante el porcentaje de positividad (PP+). Posteriormente, los cerdos fueron eutanasiados para la evaluación y conteo de cisticercos en la canal, los cuales se clasificaron como viables o degenerados. No se observaron cisticercos sanos en cerdos que recibieron dos dosis de vacuna; además se observaron mejores resultados mediante el uso de la vacuna IILTSOL18+Adyuvante QuilA (ausencia tanto de quistes sanos como degenerados). Los cerdos de T3 presentaron valores más altos de PP+, con una mediana de 67.3. Se concluye que la vacuna IILTSOL18+Adyuvante QuilA aplicada al día 0 y 23 del estudio presenta un mejor nivel de protección en comparación a los otros protocolos de vacunación, al no observarse quistes sanos ni degenerados en las canales de los cerdos y presentar valores más altos de PP+ mediante la prueba de ELISA.

Palabras clave: Porcino, *Taenia solium*, vacunación, vacuna TSOL18

ABSTRACT

Porcine cysticercosis due to *Taenia solium* parasite causes a great economic and health impact in rural areas of different countries, different control strategies have been evaluated to demonstrated their effectiveness in the field. This study evaluated the protection of pigs by using two recombinant TSOL18 antigen vaccines, with two types of adjuvants and two immunization schedules in an experimental infection assay. Forty-nine pigs 2 months-old were distributed in the following treatments: ^{T1}IILTSOL18 Vaccine + ISA206V; ^{T2}UMTSOL18 Vaccine + QuilA; ^{T3}IILTSOL18 Vaccine + QuilA; ^{T4}IILTSOL18 Vaccine + ISA206V; ^{T5}Control. Vaccination was performed at days 0 and day 23 of study in pigs for treatments T2, T3 and T4, whereas pigs from treatment T1 were only vaccinated at day 23. Oral challenge in pigs with *T. solium* proglottids administrated orally was performed at day 37 study, and pigs were then kept under controlled conditions for 12 additional weeks. An Indirect ELISA for detection of anti TSOL18 antibodies, in blood serum was also performed, which is interpreted by the percentage of positivity (PP+). Pigs were subsequently euthanized for the evaluation of cysticerci in the carcass, which were classified as viable or degenerated. No healthy cysticerci were observed in pigs receiving two doses of vaccine, and also better results were observed by using the IILTSOL18 Vaccine + QuilA adjuvant (absence of both healthy and degenerate cysticerci). Pigs of T3 had higher values of PP+ with a medium value of 67.3. It is concluded that the IILTSOL18 Vaccine + QuilA adjuvant at days 0 and 23 of the study had a higher level of protection compared to other vaccination protocols, based on the absence of both healthy nor degenerated cysticerci in pig carcasses and the higher values PP+ obtained by ELISA test.

Keywords: Porcine, *Taenia solium*; vaccination; TSOL18 vaccine

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Cronograma de actividades realizadas durante la fase experimental	33
Cuadro 2.	Distribución de cerdos en cada uno de los tratamientos con las vacunas recombinantes IILTSOL18 y UMTSOL18, 2012.....	35
Cuadro 3.	Segmentos de la canal porcina para la evaluación de la presencia de quistes de <i>cysticercus cellulosae</i>	40
Cuadro 4.	Resultados estadísticos descriptivos de carga parasitaria (quistes de <i>cysticercus cellulosae</i>) por cada tratamiento.....	43
Cuadro 5.	Distribución de la frecuencia de cerdos positivos con diagnóstico de quistes totales (<i>cysticercus cellulosae</i>) por grupo de tratamiento.....	44
Cuadro 6.	Resultados estadísticos descriptivos de la evaluación de los valores de porcentaje de positividad PP + por tratamientos	45
Cuadro 7.	Resultados de seropositividad PP+, a anticuerpos vacunales, en cerdos vacunados	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Escólex de <i>T. solium</i>	5
Figura 2.	Huevo tipo <i>Taenia sp</i>	6
Figura 3.	Oncósferas de <i>Taenia solium</i>	7
Figura 4.	Cisticercosis de <i>Taenia solium</i> (<i>cysticercus cellulosae</i>).....	8
Figura 5.	Ciclo biológico de <i>Taenia solium</i>	10
Figura 6.	Países endémicos a <i>Taenia solium</i>	12
Figura 7.	Toma de muestra de sangre en lechones.....	32
Figura 8.	Inmunización de los animales con la vacuna IILTSOL18 o UMTSOL18.....	36
Figura 9.	Sangrado de los animales.....	37
Figura 10.	Desafío de los cerdos con un proglótido grávido de <i>Taenia solium</i>	38
Figura 11.	Eutanasia de los animales.....	39
Figura 12.	Quistes degenerados de <i>cysticercus cellulosae</i> visualizados durante la evaluación de la canal porcina.....	40
Figura 13.	Histograma de distribución de cargas parasitarias (<i>cysticercus cellulosae</i>) en función a los grupos de tratamiento.....	42
Figura 14.	Distribución de las medianas de los valores de porcentaje de positividad (PP+) en cada grupo de tratamiento.....	44

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1.	Constancia del Comité de Ética y Bienestar Animal.....	63
ANEXO 2.	Procedimiento de la Prueba de ELISA Indirecto.....	64
ANEXO 3.	Número de quistes sanos, degenerados y totales (<i>cysticercus cellulosae</i>) encontrados en cada individuo durante la evaluación de la canal.....	65
ANEXO 4.	Valores de PP+ para cada individuo por día de sangrado.....	67
ANEXO 5.	Gráficas Box Plot para evaluar la respuesta de anticuerpos a través del tiempo de estudio en cada tratamiento	69

LISTA DE ABREVIATURAS

TSOL16	: Antígeno de <i>T. solium</i> de 16 kDa
TSOL18	: Antígeno de <i>T. solium</i> de 18 kDa
TSOL45	: Antígeno de <i>T. solium</i> de 45 kDa
<i>T. solium</i>	: <i>Taenia solium</i>
NCC	: Neurocisticercosis
DNA	: Dexosyribonucleic acid
CWGP	: Cysticercosis Working Group in Perú
IgM	: Inmunoglobulina M
IgA	: Inmunoglobulina A
IgG	: Inmunoglobulina G
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
PP	: Porcentaje de positividad
DO	: Densidad óptica
UNMSM	: Universidad Nacional Mayor de San Marcos
FMV	: Facultad de Medicina Veterinaria
GALVmed	: Global Alliance for Livestock Veterinary Medicine
IIL	: Indian Immunologicals Limited
UM	: Universidad de Melbourne
UNAM	: Universidad Nacional Autónoma de México
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
OPS	: Organización Panamericana de la Salud
OMS	: Organización Mundial de la Salud
OFZ	: Oxfendazol

I. INTRODUCCIÓN

Taenia solium es un parásito cestodo zoonótico cuyo hospedero definitivo es el humano, el cual alberga la forma adulta en el intestino, y cuyo único hospedero intermediario natural es el cerdo, que va albergar la forma larvaria o cisticerco (García *et al.*, 2001). La cisticercosis humana presenta una distribución mundial pero tiene un mayor impacto sanitario en las áreas rurales de los países en desarrollo como los de América Latina, Asia y África (OMS, 2018). Es importante la detección efectiva de la cisticercosis porcina, ya que el consumo de carne infectada es la causa directa de la teniasis en humanos y las áreas geográficas con presencia de cisticerco de *T. solium* son un indicador de áreas infectadas por el parásito adulto (Acha & Szyfres, 2003).

Esta enfermedad debe ser controlada y erradicada debido a que es una causa frecuente de epilepsia y otros síntomas neurológicos en el Perú y la mayoría de países endémicos (García *et al.*, 2001). Una estrategia efectiva para controlar y eliminar el parásito *T. solium* va implicar una intervención multilateral que incluya el tratamiento en paralelo de las poblaciones humana y porcina. Sin embargo, la dificultad y el alto costo para implementar estos sistemas es considerado un limitante de la efectividad de estos procesos (Lightowlers, 2017). Una posible medida de control eficaz es interrumpir el desarrollo del cisticerco en el hospedero intermediario, mediante la aplicación de una vacuna basada en antígenos específicos de la oncósfera (Lightowlers, 2003).

Se han investigado varios antígenos recombinantes protectores como potenciales vacunas para cerdos, incluyendo la vacuna S3P (Sciutto *et al.*, 2008) y otros antígenos protectores provenientes de oncósferas de *T. solium*. Se han clonado tres distintos antígenos que han sido designados como TSOL16, TSOL18 y TSOL45 (Gauci *et al.*, 2003). Estos antígenos han demostrado la capacidad de inducir una respuesta inmunológica alta en los cerdos desafiados de manera experimental (Gauci *et al.*, 2013).

Ha sido generada una vacuna recombinante utilizando el antígeno TSOL18, que ha brindado una completa protección en cerdos vacunados desafiados con huevos de *T. solium* (Lightowlers, 2003), bajo condiciones experimentales en diversas localizaciones geográficas tales como México, Honduras, Ecuador, Perú y Camerún (Flisser *et al.*, 2004; Lightowlers, 2006; Assana *et al.*, 2010; Gauci *et al.*, 2013). La vacuna utiliza la bacteria *Escherichia coli* como medio de expresión del péptido TSOL18, teniendo este sistema un bajo nivel de expresión, mayor inestabilidad y altas dificultades de purificación a gran escala (Xuepeng *et al.*, 2008). Estudios alternativos han evaluado la expresión del péptido TSOL18 en un sistema de expresión eucariota, la levadura *Pichia pastoris*, debido a que este sistema es más eficiente y económico (Xuepeng *et al.*, 2008).

Se necesita un modo de control y erradicación de la enfermedad, que sea de fácil acceso en las zonas rurales donde el sistema de crianza de cerdos se realiza de manera artesanal y bajo condiciones sanitarias deficientes. Las vacunas ya mencionadas, debido a su alto nivel de protección, pueden ser utilizadas en diferentes áreas endémicas con buen margen de efectividad. En el presente trabajo se evaluó la eficacia de cuatro protocolos de vacunación basados en ambos tipos de vacunas para establecer un protocolo de vacunación alternativo y efectivo.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. GENERALIDADES

Taenia solium es un parásito de tipo cestodo que ocasiona teniasis y cisticercosis en la población humana y cisticercosis en la población porcina (Acha & Szyfres, 2003). Estas enfermedades prevalecen tanto en áreas urbanas como rurales y se encuentran asociadas a prácticas tradicionales de crianza de cerdos, deficientes condiciones sanitarias, falta de educación y pobreza (Sarti-Gutierrez *et al.*, 1988). La cisticercosis causada por la forma larvaria *cysticercus cellulosae*, es considerada una enfermedad de gran importancia zoonótica debido a su distribución a nivel mundial, además de tener un alto impacto sanitario y económico en las comunidades rurales de los países en desarrollo de América Latina, Asia y África (Schantz, 2002; OMS, 2018).

La mayoría de los países desarrollados tales como Europa, Estados Unidos y Canadá han sido considerados libres de cisticercosis pero se han reportado casos de la enfermedad debido al incremento de la migración humana proveniente de áreas endémicas (Murrell, 2005).

Los humanos pueden desarrollar cisticercos por infección accidental, los cuales pueden afectar tejidos como músculos, piel, ojo y sistema nervioso central (OMS, 2018). Teniendo este último un mayor impacto en Salud Pública ya que la formación de quistes a nivel cerebral, va derivar en un cuadro clínico conocido como neurocisticercosis (NCC). La NCC es el principal generador de patologías neurológicas y es la causa más frecuente de cuadros epilépticos a nivel mundial (García *et al.*, 2010). En América Latina, la enfermedad ha sido asociada a más de 400,000 pacientes sintomáticos (Bern *et al.*, 1999) y se calcula que la NCC provoca el 30% de los casos de epilepsia en los países donde ésta parasitosis es endémica (OMS, 2018). Las principales regiones comprometidas en Perú, se encuentran en la sierra, costa norte y selva alta con una seroprevalencia estimada entre el 10 y 20% y otros estudios realizados indicaron presencia de anticuerpos contra cisticercosis en el 40% de las personas con epilepsia (García *et al.*, 2010; Moyano *et al.*, 2014).

La cisticercosis porcina causa un gran impacto económico debido al decomiso de las canales infectadas y la reducción del valor de mercado de la carne porcina, llevando a la aparición de rutas informales de comercio para los animales infectados (OMS, 2018). Adicionalmente, la carencia de condiciones higiénicas y sanitarias de muchas zonas rurales endémicas favorece la persistencia del parásito entre humanos y porcinos (Murrell, 2005).

2.2 TAXONOMÍA DEL PARÁSITO

De acuerdo con el sistema actual de taxonomía, *Taenia solium* (*T. solium*) pertenece al *Phylum*: Platyhelminthes, *Clase*: Cestoda, *Subclase*: Eucestoda, *Orden*: Cyclophyllidea, *Familia*: Taeniidae, *Género*: *Taenia* (Smyth, 1994). Los parásitos pertenecientes a este grupo son hermafroditas y presentan morfología aplanada dorso-ventral (Soulsby, 1987). *Taenia solium*, *Taenia saginata* (*T. saginata*) y *Taenia asiatica* (*T. asiatica*) son consideradas las especies de cestodos más importantes por su capacidad de afectar a la población humana. Sin embargo, algunos autores han propuesto considerar a *T. asiatica* como una subespecie de *T. saginata* (Pawlowski, 2002).

2.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Taenia solium*

2.3.1 Fase adulta

Taenia solium es un parásito específico de los seres humanos y es considerado como potencialmente peligroso para la salud pública (Pawlowski, 2002). La fase adulta presenta morfología dorso-ventral aplanada y puede alcanzar hasta 7 metros de longitud (Náquira, 1999). No posee cavidad celómica ni aparato digestivo y posee un tegumento que puede resistir la bilis y el ácido gástrico y mantiene la permeabilidad intacta para poder realizar el proceso de alimentación mediante absorción a través de su superficie corporal (Burton *et al.*, 2012). Durante la fase adulta se observan tres porciones distinguibles: la cabeza o escólex, el cuello y el cuerpo o estróbilo.

El escólex (Figura 1) es el órgano de fijación del parásito a la mucosa intestinal, tiene forma globular (1mm de diámetro), está armado con cuatro ventosas y un rostelo conformado por una doble hilera de 22 a 32 ganchos característicos (Wardle *et al.*, 1974; Náquira, 1999).

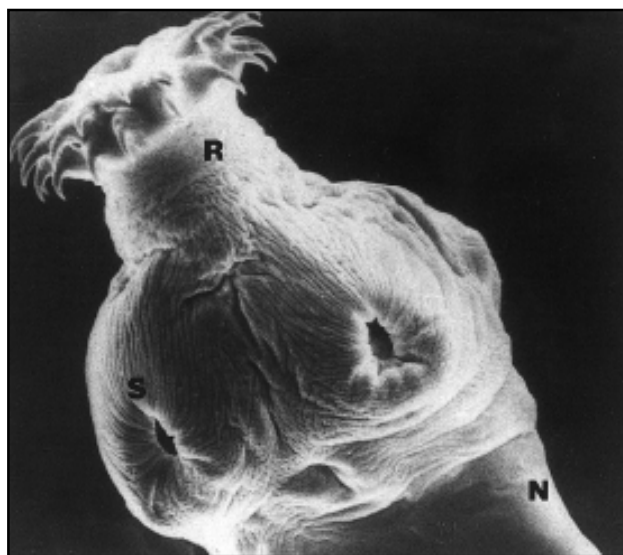


Figura 1. Escólex de *Taenia solium*. R: Rostelo; S: Ventosas; N: Cuello (Imagen obtenida de Sciutto *et al.*, 2000)

El cuello es una estructura corta y no segmentada que puede llegar a medir desde 5 a 10mm de longitud y posee una gran actividad metabólica para poder formar los proglotis que constituyen el cuerpo del parásito (Náquira, 1999). El cuerpo o estróbilo es la porción más larga del parásito y está conformada por un número promedio de 700 a 1000 proglotis. Los proglotis están divididos de acuerdo a su estadio de maduración en: inmaduros, maduros y grávidos (Pawlowski, 2002), siendo los proglotis grávidos los que son eliminados en las heces y liberan los huevos de *T. solium* al medio ambiente (Náquira, 1999).

Los huevos de *T. solium* son considerados la fase infectiva de la cisticercosis, son morfológicamente indistinguibles dentro del género *Taenia sp.* (Pawlowski, 2002). Son esféricos y presentan un tamaño variable entre las 20 - 50 micras (Figura 2). Tienen una característica forma estriada debido a que están cubiertos por una membrana radiada, denominada embrióforo, que se origina a partir de bloques secretados de proteína de tipo queratina y unidas de manera contigua (Morseth, 1966; Flisser *et al.*, 2005).



Figura 2. Huevo tipo *Taenia sp.* Se caracterizan por su forma esférica y apariencia radiada. (Imagen tomada de la UNAM)

La oncósfera (Figura 3) o embrión hexacanto es una larva globular de 30 μ m de diámetro, compuesta por varias células diferenciadas en sistema muscular, sistema excretor y sistema nervioso, además de 6 ganchos embrionarios característicos y un par de glándulas que ayudan en su proceso de migración dentro del hospedador (Smyth, 1994).

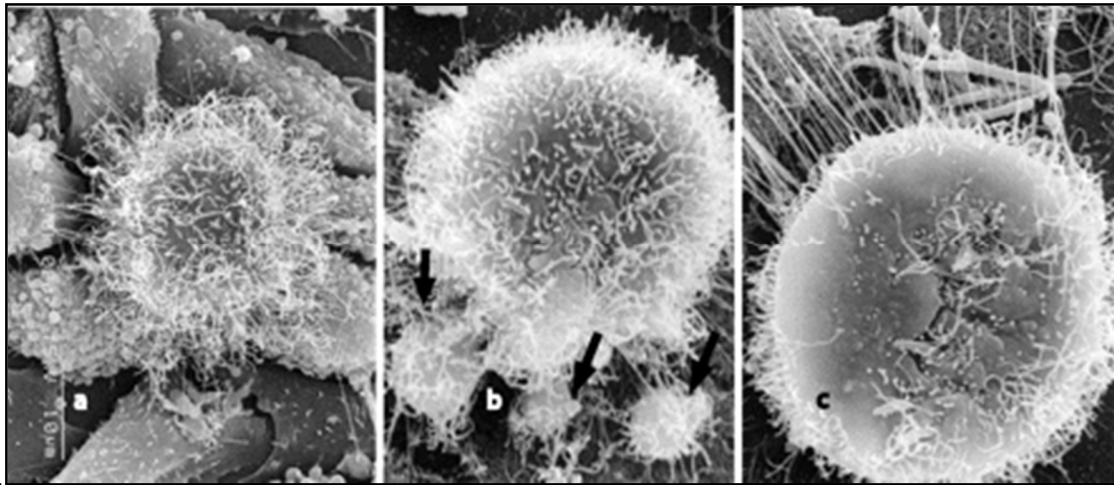


Figura 3. Oncósferas de *Taenia solium*. A: Adherencia a la superficie mediante alargamiento de microvellosidades. B: Vesículas secretorias (flechas). C: Presencia de ganchos en la superficie de la oncósfera (Imagen obtenida de Verástegui *et al.*, 2007)

Estudios *in vitro* mencionan un estadio transicional denominado forma Postoncosferral (PO), la cual es considerada una forma intermedia entre la oncósfera y el cisticerco completamente desarrollado, siendo considerado un estadio temprano del metacestodo. Morfológicamente hay una desaparición de los ganchos observados durante la forma larvaria y se visualizan vesículas y microvellosidades en el tegumento (Chile *et al.*, 2016). Las formas PO llegaban a medir 2.5mm a los 60 días de cultivo *in vitro* y al ser inoculados de forma experimental en roedores lograban desarrollarse en cisticercos maduros a los 15-30 días posteriores (Chile *et al.*, 2016).

2.3.2 Fase larvaria

El cisticerco de *T. solium*, denominado como *cysticercus cellulosae*, es una vesícula llena de líquido opalescente (Figura 4), de 11 x 8 mm de diámetro, esferoide y ubicado en el sentido de las fibras musculares a manera de granos de arroz. Histológicamente la vesícula está formada por tejido fibroso que la separa del tejido circundante, y posee tejido parenquimatoso que contiene al escólex de la tenia adulta invaginada (Cordero Del Campillo & Rojo, 1999; Pawlowski, 2002). El escólex tiene cuatro ventosas y dos hileras de ganchos de tamaño variado (Soulsby, 1987; Cordero Del Campillo & Rojo, 1999).

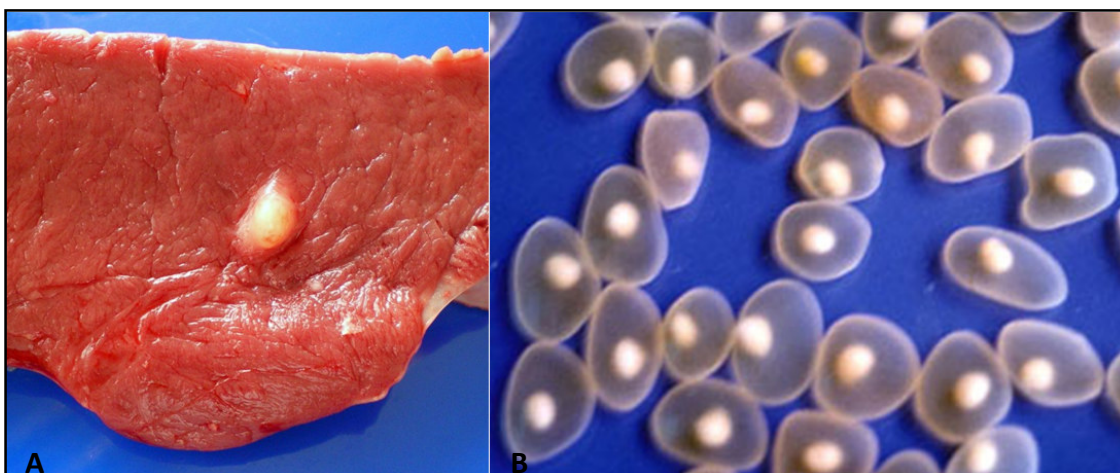


Figura 4. Cisticercos de *Taenia solium* (*cysticercus cellulosae*). A: Presencia de cisticerco en musculatura. B: *Cysticercus cellulosae*, nótese el escólex y el líquido opalescente en el cual está embebido (Imagen tomada de la UNAM).

2.4 METABOLISMO DE *Taenia solium*

Los cestodos son considerados modelos biológicos de excepcional interés en fisiología, debido al hábitat inusual en los que se desarrollan y a la ausencia de un canal alimenticio (Burton *et al.*, 2012). La utilización de carbohidratos es de vital importancia para los cestodos, pues los estudios realizados en ratas infectadas con *Hymenolepis diminuta* demostraron que dietas deficientes en carbohidratos limitan el crecimiento de estos parásitos *in vivo* (Tsai *et al.*, 2013). Se ha demostrado que los cestodos son capaces de fijar moléculas de dióxido de carbono y son capaces de utilizar moléculas grandes como proteínas, por toma directa o mediante el mecanismo de digestión de membrana (Smyth, 1994).

El concepto de digestión de membrana, desarrollado por Ugolev (1965) contempla la producción de enzimas dentro o sobre la membrana que cubre las superficies proteicas. En relación a los lípidos, los resultados de estos estudios han demostrado que los ácidos grasos y esteroides de los parásitos y hospedadores son casi idénticos. Sin embargo, deben existir mecanismos específicos de control de lípidos en los cestodos (Tsai *et al.*, 2013).

2.5 CICLO BIOLÓGICO

El ciclo de *Taenia solium* involucra la interacción entre el parásito, dos hospedadores y el medio ambiente (Pawlowski, 2002) (Figura 5). El ser humano es el hospedador definitivo de la tenia adulta y el cerdo es el hospedador intermediario habitual para la fase larvaria o cisticerco (*cysticercus cellulosae*) (Del Brutto & García, 2015). El ser humano puede ser el hospedador intermediario accidental de la fase larvaria de *T. solium* al ingerir los huevos por contaminación oral – fecal (Náquira, 1999; García *et al.*, 2003c).

Los seres humanos desarrollan teniasis al consumir carne de cerdo infectada con cisticercos viables e insuficientemente cocida (Flisser *et al.*, 2005). Luego de la ingestión, el cisticerco se activa en el intestino del hospedador donde la temperatura, enzimas gástricas e intestinales y sales biliares favorecen el desenquistamiento y evaginación del escólex (Quiroz, 1999; Schantz, 2002). El escólex se va fijar a la mucosa del tercio superior del intestino por medio de sus ventosas y ganchos (Quiroz, 1999). La tenia se desarrolla y en un promedio de dos meses va empezar a producir los proglotis grávidos, que pueden contener entre 50 a 60 mil huevos infectivos (Flisser, 1994). Los proglótidos grávidos pueden liberarse dentro de las excretas con una frecuencia de dos o tres veces por semana (Murrell, 2005).

El cerdo actúa como hospedador intermediario de la fase larvaria de *T. solium* (Quiroz, 1999). Estos animales pueden infectarse al consumir huevos contenidos en proglotis eliminados en las heces debido a sus hábitos coprofágicos o al ingerir alimentos y agua contaminada con huevos dispersados al destruirse el proglotis (Cordero Del Campillo & Rojo, 1999). El número de huevos de *T. solium* requeridos para producir la infección en los porcinos, de manera experimental, fue entre 1000 y 380 000 (Pawlowski, 2002). Estudios experimentales han demostrado la capacidad transportadora de huevos infectivos de *T. solium* en escarabajos estercoleros (*Ammophorus rubripes*) presentes en áreas rurales, como un modo de continuidad de la infección, los cerdos pueden desarrollar cisticercos viables al ingerir estos escarabajos (Gomez-Puerta *et al.*, 2018).

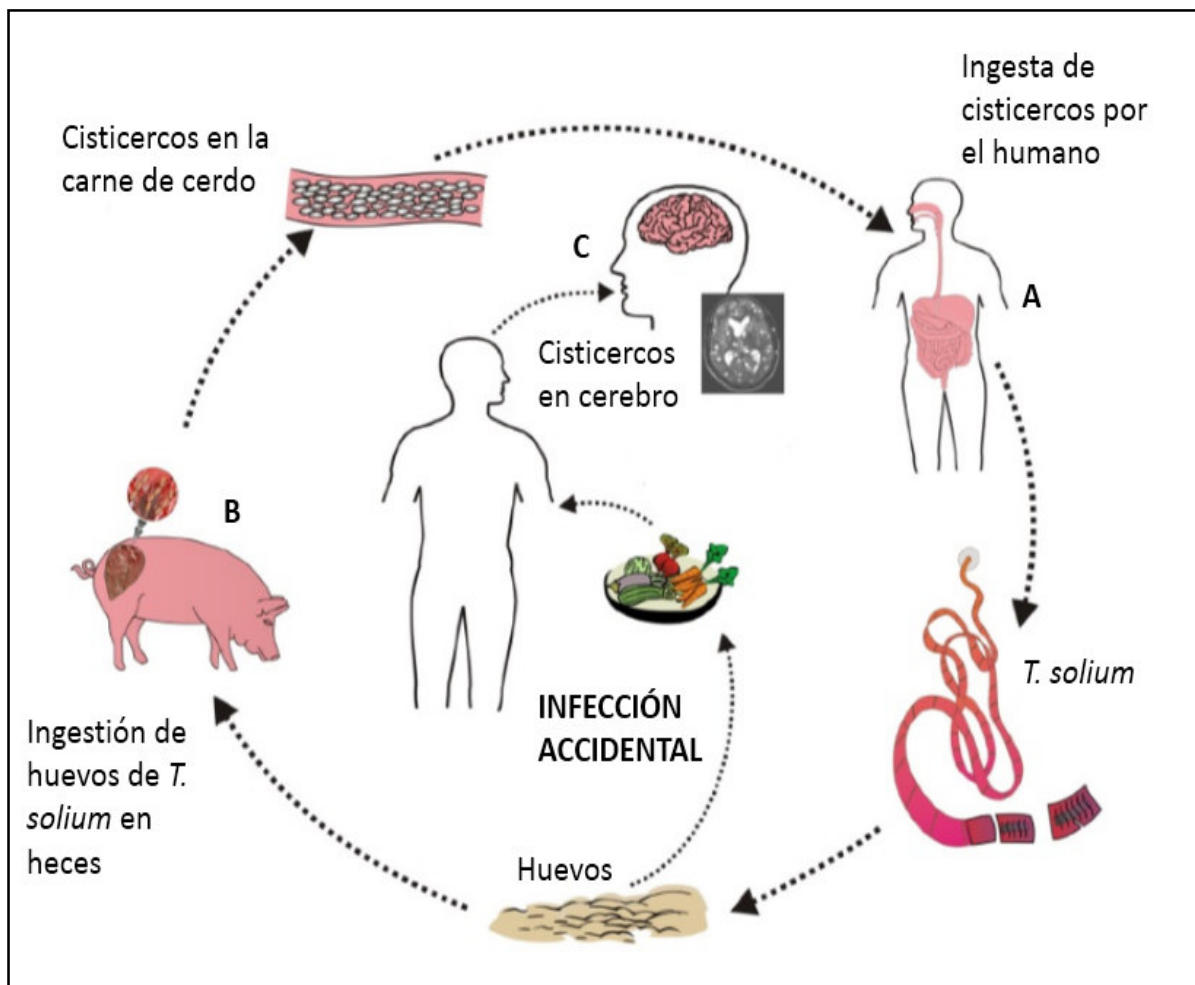


Figura 5. Ciclo biológico de *Taenia solium*. A y B: El parásito alterna sus estados de desarrollo en el hospedador definitivo e intermediario, humano y cerdo respectivamente. C: El humano puede actuar como intermediario al ingerir accidentalmente huevos infectados, desarrollando Neurocisticercosis.

Al ser ingeridos, los huevos quedan expuestos a la acción de las secreciones digestivas que liberan al embrión hexacanto u oncósfera (Náquira, 1999). El proceso de activación de la oncósfera va depender de las enzimas gástricas e intestinales y sales biliares. Posteriormente el embrión hexacanto se va adherir a la mucosa intestinal y va penetrar la pared del intestino para alcanzar los vasos sanguíneos y ser transportado a diferentes partes del cuerpo, tales como cerebro, músculo estriado, tejido conectivo, corazón, ojo e hipodermis (Náquira, 1999; Schantz, 2002). El embrión hexacanto de *T. solium* va transformarse en quistes a las diez o doce semanas post infección (García *et al*, 2003a).

El ser humano puede desarrollar la fase larvaria de *T. solium* de forma accidental, los quistes pueden localizarse en cualquier lugar del organismo, siendo la localización más frecuente en el sistema nervioso central llevando a un cuadro clínico conocido como Neurocisticercosis (NCC) (García *et al.*, 2003a). Esto ocurre por dos mecanismos, el primero mediante infección fecal-oral debido a la falta de un adecuado control sanitario en la población afectada por la *T. solium* (García *et al.*, 2003a). La segunda por autoinfección endógena, mediante retroperistaltismo, en el cual los proglotis presentes en el intestino ascienden hasta el estómago debido a un reflejo emético. Los proglotis se degeneran y se libera el embrión hexacanto al estar en contacto con los jugos gástricos. (Cordero Del Campillo & Rojo, 1999; Acha & Szyfres, 2003). Sin embargo, aún no se ha comprobado este mecanismo.

2. 6 CISTICERCOSIS PORCINA

2.6.1 Epidemiología de la Cisticercosis Porcina

La infección por la larva de *T. solium* (*cysticercus cellulosae*) en los cerdos, constituye un grave problema de Salud Pública, principalmente en zonas rurales con niveles sociales y sanitarios deficientes (González, 2002). En condiciones naturales la única fuente de infección para los cerdos son las heces de un ser humano infectadas con huevos de *T. solium*. En lugares con sistemas de crianza porcino tradicionales, se pueden observar casos de teniasis humana y cisticercosis porcina con niveles de prevalencia variables (Acha & Szyfres, 2003).

Las tasas de seroprevalencia de cisticercosis porcina se asocian a los niveles de transmisión de la *T. solium* en una región determinada (Figura 6). El muestreo de cerdos es más accesible que el seguimiento en humanos ya que la infección porcina es más común que la infección en humanos y los cerdos tienen un ciclo de vida más corto en condiciones de campo, por lo que resulta más útil (García *et al.*, 1999). La presencia del parásito es variable en los países endémicos, pero los informes indican que 1 de cada 1000 personas es portador de la tenia adulta; además el 1-10% de personas y el 20-40% de los cerdos están infectados

con cisticercosis. Las prevalencias de estas enfermedades están muy relacionadas con el ciclo reproductivo de la *T. solium*, ya que el parásito puede llegar a producir millones de huevos infectivos pero sólo unos pocos de éstos van a desarrollar cisticercos viables para la generación de la tenia adulta (Sciutto *et al.*, 2000).

A nivel mundial, la cisticercosis es considerada endémica en países en desarrollo como Asia, África Sub-Sahariana y América Latina (Murrell, 2005; OMS, 2018). Actualmente es considerada como una parasitosis reemergente en países no endémicos, como EEUU, Canadá, Australia, Japón, países de Europa e incluso países musulmanes debido al incremento de las tasas de inmigrantes provenientes de países endémicos (Del Brutto, 2012; Gabriël *et al.*, 2017). La erradicación de *T. solium* en Europa, fue realizada mediante diversos factores, tales como la mejora de la Salud Pública, la educación de la población, las inspecciones adecuadas a la carne porcina en los camales y la tecnificación de la crianza porcina (Sciutto *et al.*, 2000; García *et al.*, 2007).

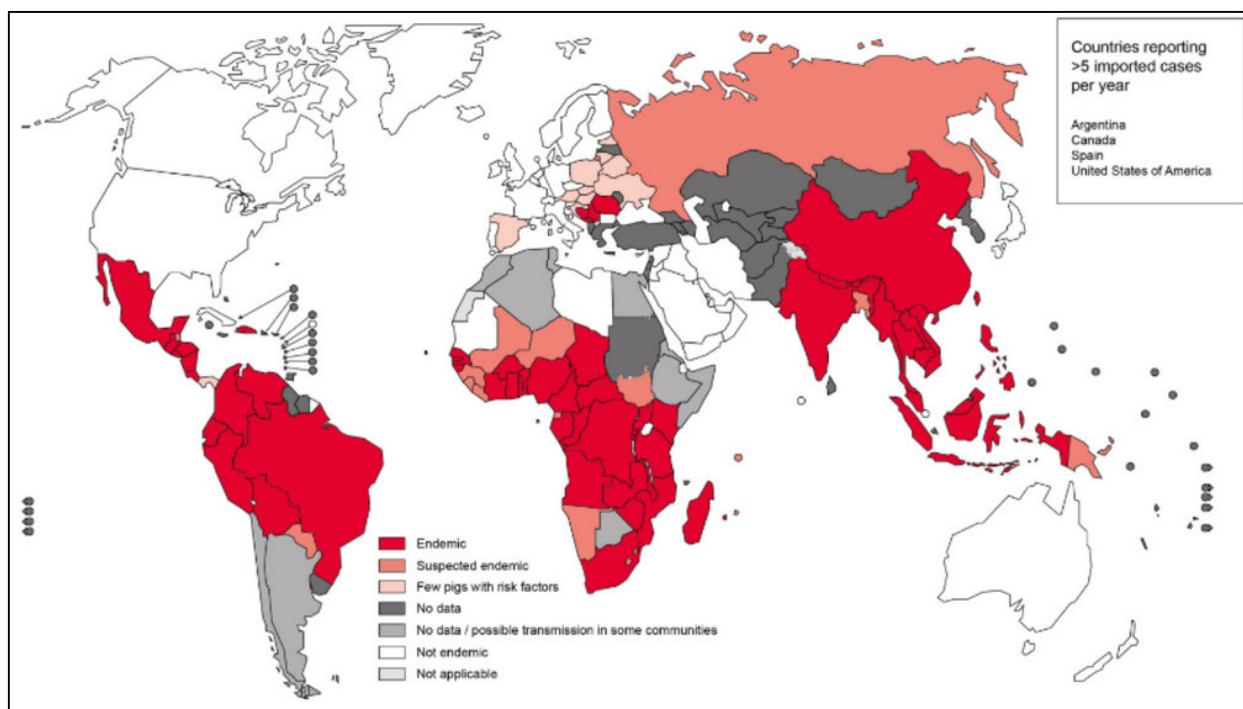


Figura 6. Países endémicos a *Taenia solium*. (Imagen obtenida de la OMS, 2015)

En Asia, se ha incrementado la presencia del parásito y es la principal causa de epilepsia en más del 50% de pacientes en países no endémicos como India, China, Indonesia, Tailandia, Korea, Taiwan y Nepal. Dicha información epidemiológica está reportada y disponible sólo en unos pocos países (Rajshekhar *et al.*, 2003). Un porcentaje del 50% de la infección por *T. solium* fue reportado en un área de Nepal ocupado principalmente por criadores rurales de cerdos. La pobreza, las prácticas de crianza insalubre de cerdos, los bajos estándares sanitarios, y la inusual costumbre de comer carne cruda de cerdo, son factores contribuyentes a la propagación de la enfermedad en muchos países de Asia (Rajshekhar *et al.*, 2003).

Esta enfermedad afecta virtualmente a todo el Oeste y el Centro de África, a excepción de unas pocas regiones islámicas donde la carne de cerdo no es consumida por motivos religiosos (Zoli *et al.*, 2003). En el África Occidental, la cisticercosis porcina y humana han sido reportadas en Benin, Burkina Faso, Costa de Marfil, Senegal y Togo (Zoli *et al.*, 2003).

La distribución de la cisticercosis porcina es altamente prevalente en Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Perú y Venezuela mientras que en Argentina, Chile, Costa Rica, El Salvador, Haití, Panamá la cisticercosis porcina existe pero no es frecuentemente diagnosticada (OMS, 1993). En Belice, República Dominicana, Antigua y Barbuda, Bahamas, Barbados, Bermudas, Cuba, Granada, Guyana, Jamaica, Paraguay, Uruguay, Surinam y Trinidad y Tobago no existe la parasitosis en los cerdos o no ha sido reportada (Román *et al.*, 2000).

En América Latina, la cisticercosis porcina permanece endémica en las zonas rurales de muchos países. En Brasil durante el trienio 1970- 1972 en 10 de sus estados, 12 millones de porcinos fueron sacrificados y se registró una tasa de infección por *C. cellulosae* de 0.83%. Tasas similares han sido reportadas en Colombia y México (Acha & Szyfres, 2003). En un estudio en México, el 23% de cerdos evaluados presentaron cisticercosis mediante el examen de lengua y 35% mediante serología, mientras que en Guatemala se encontraron prevalencias de cisticercosis porcina de 14% y 4% mediante el examen de lengua a los animales *in vivo*

(Rodríguez-Canul *et al.*, 1999; García-Noval *et al.*, 1996). En los años 90, estudios realizados por el Instituto Nacional de Salud de Colombia, mostraron una prevalencia de 25.64% para cisticercosis porcina y una prevalencia de 13.24% para cisticercosis humana (Flórez *et al.*, 2013).

2.6.2 Cisticercosis Porcina en el Perú

La cisticercosis porcina es considerada la principal zoonosis parasitaria en el Perú, con seroprevalencias que alcanzan el 25% en humanos (García *et al.*, 2003b) y 75% en porcinos (González *et al.*, 1996). Diversos estudios epidemiológicos revelan niveles de cisticercosis variables (González, 2002) encontrándose en un rango del 20% al 42% en los caseríos endémicos peruanos y hasta en un 75% en áreas hiperendémicas (García *et al.*, 1999). Estudios realizados en la selva mostraron prevalencias oscilantes de 43% (Díaz *et al.*, 1992) a 49%. Carhuallanqui *et al.* (2007) estimaron el grado de infección de cisticercosis porcina en cerdos de cuatro caseríos del distrito de Omia, Amazonas, obteniendo seroprevalencias variables desde 4.8% a 71.4%, con una prevalencia media de 28%.

En la sierra peruana, las tasas de infección varían de 30% (Ramos, 1999) a 72% (Bernal, 1996). Por otro lado, en la costa, las prevalencias promedio son de 26%, aunque un estudio realizado en Matapalo, Tumbes, estimó una incidencia de 11.5% (Mena, 2004). Contrariamente, García *et al.* (2010) encontraron prevalencias altas por encima del 70% en tres caseríos del departamento de Tumbes, de un total de 17 evaluados. Por estos motivos, se considera a Perú como una zona endémica a cisticercosis porcina.

Uno de los principales factores de riesgo de infección de humanos a porcinos es la crianza rural incontrolada de cerdos, que permite el acceso de los animales a excretas humanas. Se ha demostrado que las tasas de infección con *T. solium* en cerdos de crianza rural refleja el nivel de contaminación en el medio ambiente (González *et al.*, 1999b). Debido a sus hábitos coprófagos, el cerdo de crianza rural libre va buscar las excretas humanas, con lo que tendrá la posibilidad de ingerir una gran cantidad de huevos eliminados al medio ambiente y desarrollar cisticercosis masiva. El estudio de Lescano *et al.* (2007) demostró que

las tasas de infección pueden ser superiores en cerdos que viven cerca de personas portadoras de *T. solium*, mientras que la restricción de los cerdos en corrales disminuye la infección en cerdos (García *et al.*, 1999).

El comercio de cerdos en mercados informales y la falta de cultura médica con respecto a la enfermedad favorecen la persistencia de la misma (Cysticercosis Working Group in Perú, 1993). La carne porcina que presente alteraciones causadas por la cisticercosis, va ser confiscada en camales y centros de beneficio sin retribución económica al campesino. Por este motivo, los criadores habilitan diversas rutas de comercio informal y/o matanza de traspatio para porcinos en áreas rurales con alta prevalencia de la infección (Cysticercosis Working Group in Perú, 1993). La cisticercosis representa únicamente un factor económico para el productor altoandino, sin tomar en cuenta el verdadero impacto sanitario de la enfermedad (González, 2002).

2.6.3 Importancia de la cisticercosis en la Salud Pública

En las áreas rurales endémicas de Perú, el 80% de las personas con problemas de cisticercosis no van a presentar sintomatología clínica (Pal *et al.*, 2000). En los otros casos, la sintomatología está relacionada con signos neurológicos, que puede ser, desde un leve dolor de cabeza, mareos o convulsiones ocasionales hasta con un cuadro neurológico muy grave con hipertensión intracraneal o demencia (Sciutto *et al.*, 2000). La mayoría de los casos de epilepsia en el mundo son consecuencia de la Neurocisticercosis (OMS, 2018).

Las manifestaciones clínicas se pueden presentar de diversas maneras y son causadas por la respuesta inflamatoria del sistema inmune del hospedero después de la muerte del metacestodo en el cerebro (Pal *et al.*, 2000; Hiepe, 2011). Los síntomas clínicos, la intensidad y los efectos de esta enfermedad en el ser humano, va depender de la ubicación, tamaño y la cantidad de los cisticercos; y también por los factores del hospedero como es el grado de su inmunidad y las reacciones inflamatorias que puede desarrollar (Sciutto *et al.*, 2000).

Las costumbres locales y hábitos alimenticios van a tener una estrecha relación con la transmisión de *T. solium*. En países asiáticos como Indonesia, Vietnam, Nepal y Corea, el consumo de carne de cerdo cruda es costumbre durante los días festivos, lo cual va contribuir a la transmisión de la parasitosis, mientras que en regiones predominantemente musulmanas no se ha reportado la existencia de la infección (Rajshekhar *et al.*, 2003).

Además esta enfermedad puede constituir un grave problema de salud pública a nivel mundial debido al incremento de su incidencia en países industrializados a causa de la migración de personas provenientes de áreas endémicas (García *et al.*, 2003b, 2003c).

2.6.4 Impacto económico de la Cisticercosis Porcina

Las pérdidas económicas ocasionadas por *T. solium* afecta a la industria porcina, principalmente en países endémicos. En Centroamérica, los informes de los centros de beneficio indicaron que el 68% de decomisos de carne de cerdo se debieron a la presencia de cisticercosis, ocasionando una pérdida de hasta medio millón de dólares. En México, durante los años 80 las pérdidas económicas por decomiso de carne infectada bordearon los 43 millones de dólares (Acha & Szyfres, 2003). Esta situación ha llevado a la aparición del comercio informal de cerdos, subestimando así la magnitud real de la enfermedad (CWGP, 1993).

En zonas endémicas la importancia de la enfermedad representa un factor de precio, debido a que en los mercados informales los cerdos infectados valen la mitad o la tercera parte del precio de un cerdo sano (González *et al.*, 1990). Del mismo modo, en mercados formales los cerdos infectados son confiscados sin retribución alguna a sus criadores, lo cual va incentivar la creación de vías informales de comercio, favoreciendo el incremento y la persistencia de la enfermedad y la subestimación del impacto real del problema en Salud Pública debido a la falta de verdaderos datos de prevalencia (CWGP, 1993).

2.7 DIAGNÓSTICO DE LA CISTICERCOSIS PORCINA

2.7.1 Diagnóstico *ante-mortem*

Es importante el diagnóstico temprano y eficaz de la cisticercosis porcina ya que el consumo de carne infectada es la causa directa de teniasis en los seres humanos pero, el diagnóstico de la cisticercosis porcina en animales vivos mediante observación clínica es poco posible de realizar. La enfermedad generalmente es asintomática en los cerdos porque los animales son sacrificados antes que los quistes lleguen a un estado degenerativo causante de la sintomatología clínica en los humanos (García *et al.*, 2003). Sin embargo, se puede realizar la palpación de la lengua, en donde pueden sentirse los cisticercos en casos de infecciones masivas (Acha & Szyfres, 2003). La inspección de la lengua es una prueba simple, con una sensibilidad del 70% y una especificidad del 100% pero que requiere bastante habilidad y experiencia del operario (González *et al.*, 1990). Los quistes viables o en calcificación tardía son fácilmente palpables, aunque los quistes calcificados de manera temprana son muy pequeños y difíciles de detectar (González, 1993).

Las pruebas serológicas constituyen una herramienta poderosa para el monitoreo de *T. solium*, ya que la obtención de sangre en los cerdos es culturalmente más aceptado por la población, son de procesamiento rápido y poco peligrosas para el personal (González *et al.*, 1990). Las más utilizadas en las evaluaciones de campo son las Pruebas de Inmunoensayo Ligado a Enzimas (ELISA) y la Electro Inmunotransferencia Blot (EITB).

Las pruebas serológicas de detección de anticuerpos pueden fallar en la detección de cisticercosis en porcinos bajo condiciones de crianza rurales y que posean bajas cargas infectivas, lo cual es un gran problema debido a que la principal fuente de cisticercosis por *T. solium* es el cerdo rural (Murrell, 2005). Entonces se va considerar que los animales con poca carga parasitaria y persistencia de inmunidad pasiva son una fuente potencial de sesgo diagnóstico (Sciutto *et al.*, 1998). Este método va ser utilizado en pruebas experimentales controladas porque es poco sensible pero altamente específico para realizar diagnósticos (Murrell, 2005).

Las pruebas de captura de antígenos permiten el diagnóstico de infecciones activas. Diferentes fuentes antigénicas han sido utilizadas para estandarizar pruebas de ELISA de captura de antígenos, aunque únicamente aquellas que utilizan anticuerpos monoclonales definen los antígenos correctamente para su uso en campo (Brandt *et al.*, 1992). La utilización de antígenos de excreción/secreción de *T. solium* y antígenos provenientes de *T. crassiceps* en un formato de ELISA han demostrado niveles buenos de sensibilidad y especificidad (D'Souza & Haafez, 1999; Pinto *et al.*, 2000). No obstante, aún persiste la reacción cruzada con otras tenias emparentadas como *T. hydatigena* y *E. granulosus*.

Se ha utilizado la Prueba de EITB para NCC adaptada para el diagnóstico de cisticercosis porcina, presentando una sensibilidad mayor al 95%, con un 100% de especificidad, considerándose muestras positivas si reaccionan a una o más bandas (Tsang *et al.*, 1989). La prueba de EITB con antígenos purificados es más específica e identifica las proteínas antigénicas específicas de la larva de *T. solium*, separando las glicoproteínas presentes en el extracto de los cisticercos, además detecta a los falsos positivos visualizados en la Prueba de ELISA (Parija & Ramán, 2011). No se visualiza ninguna reacción a las bandas cuando el cisticerco se encuentra en estado de calcificación (White, 1997). Diferentes estudios en el Perú utilizando la Prueba de EITB han permitido conocer las características epidemiológicas de *T. solium* (Díaz *et al.*, 1992; González *et al.*, 1999; García *et al.*, 2003a).

2.7.2 Diagnóstico *post-mortem*

El examen *post-mortem* de canales y evaluación directa de cisticercosis es considerado el “*Gold Standard*” para el diagnóstico de cisticercosis porcina (González *et al.*, 1990). Es una prueba que demanda tiempo y va dañar la apariencia de la canal debido a los minuciosos cortes que se realizan durante la inspección de las carcasas de los cerdos (tejido muscular del corazón, psoas, maseteros, serratos). Uno de los principales inconvenientes de la inspección de canales es la falta de uniformidad de la localización de quistes (OMS, 1993).

2.8 ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO Y CONTROL CONTRA LA CISTICERCOSIS PORCINA

2.8.1 Quimioterapia en porcinos

Diferentes drogas, como flubendazol, praziquantel, albendazol y oxfendazol han sido utilizadas como agentes antiparasitarios bajo condiciones experimentales y naturales de infección. Estudios iniciales utilizando flubendazol (Tellez-Girón *et al.*, 1981) y praziquantel (Flisser *et al.*, 1990) mostraron que la muerte del cisticerco no ocurre inmediatamente después del tratamiento. Estudios posteriores evaluaron la efectividad del albendazol en el tratamiento contra la cisticercosis porcina demostrándose que los animales dosificados con dosis altas de albendazol (50mg/kg oral) podían presentar efectos adversos como postración extrema y anorexia, e incluso cerdos dosificados por varios días (30mg/kg/día) exhibieron la misma sintomatología en menor medida. La necesidad de múltiples dosis y la persistencia de quistes muertos y degenerados en la canal hicieron que este régimen de tratamiento sea poco práctico de aplicar en condiciones de campo (González *et al.*, 1995).

La aparición del oxfendazol (OFZ) como la primera droga eficaz, económica y segura para el tratamiento de cisticercosis porcina (sola o en combinación con praziquantel) la convirtieron en una herramienta de potencial impacto en el control de *T. solium* (González *et al.*, 1996). Los estudios experimentales han demostrado su efectividad y seguridad a dosis única de 30mg/kg por vía oral, la cual es capaz de eliminar la totalidad de quistes en la musculatura de cerdos infectados (González *et al.*, 1997; Sikasunge *et al.*, 2008).

Se han realizado estudios complementarios para poder determinar el tiempo estimado entre la terapia con OFZ y la muerte de los parásitos (González *et al.*, 1999a). Demostrándose que se requiere al menos cuatro semanas para que los quistes mueran, mientras que a las doce semanas post-tratamiento los quistes prácticamente han desaparecido de la canal y sólo quedan pequeñas cicatrices, lo cual va significar beneficios económicos para el campesino (González *et al.*, 1999a).

Según las indicaciones del registro de OFZ para el tratamiento de cisticercosis, los animales tratados con este medicamento van requerir un período de retiro de 21 días, lo cual es poco probable de cumplir en las comunidades rurales con desconocimiento de los tiempos de retiro de medicamentos, donde es necesario el control de la transmisión de *T. solium* (Lightowlers, 2016). El medicamento administrado puede causar resistencia a infecciones posteriores en los animales dosificados pero no ofrece ningún tipo de protección a los animales que no presentaron infección previa a la cisticercosis y además, esta droga no está disponible para ser utilizado en la mayoría de los países desarrollados (Gabriël *et al.*, 2017)

2.8.2 Identificación e Intervención de Factores de Riesgo

Una medida de intervención en el control del complejo teniasis/cisticercosis es la identificación de aquellos focos en donde el riesgo de transmisión de *T. solium* está incrementado (Lescano *et al.*, 2007). La presencia de focos de transmisión de cisticercosis alrededor de portadores de *T. solium* ha sido demostrada en escenarios endémicos (Lescano *et al.*, 2007). El uso de cerdos infectados para identificar focos de transmisión tiene ventajas superiores a la identificación de casos humanos en que: 1). Los cerdos altamente infectados pueden ser reconocidos rápidamente mediante examen de lengua y 2). El corto período de vida de los cerdos (9 meses aproximadamente) nos va indicar una exposición reciente a *T. solium* (O'Neal *et al.*, 2012).

Otra medida de intervención va ser el establecimiento de campañas de educación sanitaria en las zonas rurales que presenten alto riesgo de infección; siendo ésta una estrategia efectiva de control pero va requerir de la contribución multidisciplinaria y la participación efectiva de la comunidad (Sarti-Gutierrez, 1988). Debido al alto costo involucrado en las campañas de educación sanitaria y la realidad política y económica de muchos países endémicos a *T. solium* aún no se ha puesto en marcha programas globales de control de forma inmediata (Schantz, 2002). Entonces es imprescindible la implementación de un plan que permita identificar las zonas endémicas a *T. solium*, medir las prevalencias en humanos y cerdos y evaluar la carga económica y social (García *et al.*, 2001).

En un prueba de campo realizada a largo plazo, se logró erradicar la transmisión de *T. solium* en la Provincia de Tumbes al norte del Perú, demostrando la efectividad de una estrategia de tratamiento en dicha zona al poder interrumpir el ciclo de vida del parásito (García *et al.*, 2016). La estrategia de intervención incluyó un enfoque mixto en humanos y cerdos, además de tratamientos repetidos durante un año, lo cual puede ser poco probable de realizar en otras áreas endémicas por carecer de un enfoque replicable que sea práctico y económico (Lightowlers, 2017). Otra prueba experimental llevada a cabo en Camerún logró eliminar la transmisión de la tenia adulta en la población porcina muestreada. En este caso se utilizaron de manera conjunta la vacuna TSOL18 y quimioterapia con OFZ en cerdos distribuidos en granjas en un área endémica a *T. solium*, bajo condiciones de crianza rurales (Assana *et al.*, 2010).

A pesar de estos estudios, se considera que ninguna estrategia de intervención en cerdos podrá ser efectiva para la eliminación de la transmisión de *T. solium*, ya que va necesitar ser aplicada en la población entera de cerdos y ser práctica y sostenible a largo plazo (Lightowlers, 2017). Además, los cerdos tienen un tiempo de crianza relativamente corto y nuevos animales susceptibles a la infección nacen continuamente, representando este hecho el mayor desafío para evitar la transmisión de *T. solium* (Lightowlers, 2017).

2.8.3 Vacunación contra Cisticercosis Porcina

En los últimos años, el desarrollo de una vacuna contra la cisticercosis porcina ha sido considerado por muchos investigadores como una estrategia clave en el control de la enfermedad, siendo una medida de intervención fundamental en evitar la transmisión de *T. solium* (Lightowlers, 2003). Una vacuna adecuada va tener el potencial de interrumpir el ciclo de vida del parásito y con el tiempo, disminuir el número de cerdos y personas infectadas con *T. solium* (González *et al.*, 2005). La vacunación porcina contra *T. solium* puede presentar algunos inconvenientes que deben ser manejados antes de su aplicación como medida de control.

Los estudios de campo han determinado que los cerdos se infectan con los huevos de *T. solium* a muy temprana edad, pero no se ha podido indicar la edad exacta en la que los cerdos empiezan a ser susceptibles al parásito *T. solium* (De Aluja *et al.*, 1996; Copado *et al.*, 2004). La transmisión o infección intrauterina por el parásito es poco probable, y tomando en cuenta que los cisticercos establecidos maduran a los 60 – 70 días post infección; se puede concluir que los cerdos pueden tener cisticercos maduros e infectivos a partir de los dos meses de edad (Lightowlers, 2017). Se puede considerar esta edad una base para comenzar las estrategias de vacunación. Adicionalmente la vacunación en animales adultos resulta ineficaz porque no elimina quistes ya establecidos, además su uso potencial depende del costo, ya que la cisticercosis porcina es una zoonosis y el principal interesado en su uso debería ser el campesino (González *et al.*, 2005).

2.9 EVALUACIÓN DE LA ESTRATEGIA DE VACUNACIÓN PARA EL CONTROL DE CISTICERCOSIS PORCINA

2.9.1 Inmunología del cerdo

Los órganos linfoides del cerdo son los nódulos linfáticos, el bazo, agregado linfoide asociado a mucosa y nódulos linfoides diseminados los cuales resultan de la estimulación antigénica (Binns, 1982). Los órganos linfoides en el porcino están especializados en coleccionar, procesar y presentar el material antigénico, para su reconocimiento por los linfocitos B y T. Las diferentes subpoblaciones de linfocitos se encuentran involucradas en la generación y el control de la respuesta inmune mediante diversas funciones sistémicas y locales mediadas por células y anticuerpos (Binns, 1982).

En el cerdo, la inmunoglobulina G (IgG) es predominante en el suero y calostro, además, la IgG comprende del 20 a 30% de la cantidad de inmunoglobulinas en la leche (Curtis & Bourne, 1971), mientras que la IgM comprende 14% de las inmunoglobulinas totales y 6% de las inmunoglobulinas del calostro (Porter, 1969). Por otro lado, el sistema de complemento en porcinos es más desarrollado en aquellos cerdos destetados tardíamente que

en aquellos rápidamente destetados, por lo que sugiere un nivel de ingesta de proteínas del complemento durante la lactación (Correa *et al.*, 1999).

2.9.2 Respuesta inmune contra Cisticercosis Porcina

La respuesta inmune contra la fase larvaria de *T. solium* puede ser dividida en tres fases: La primera fase ocurre luego de la ingestión de la oncósfera, la segunda fase ocurre durante el establecimiento larvario y, finalmente la tercera fase durante la destrucción de la larva (Correa *et al.*, 1999).

Durante los primeros días post-infección puede ocurrir el rechazo inmuno-mediado del parásito por parte del hospedador o el establecimiento del cisticerco. Se ha demostrado que los anticuerpos y el sistema de complemento son componentes protectores contra la oncósfera, ya que durante la primera fase ocurre una competencia entre el establecimiento de la respuesta inmune y los mecanismos de evasión inmunitaria (Correa *et al.*, 1999). Una vez que la oncósfera se adhiere al tejido del hospedador, el metacestodo desarrolla diversos mecanismos de evasión para poder sobrevivir (Correa *et al.*, 1999).

La inmunidad humoral es mediada por IgG, sugiriendo una parasitosis de larga duración (Espinoza *et al.*, 1986). Además su respuesta humoral se caracteriza por ser heterogénea. Diferentes antígenos tienen la capacidad de ser reconocidos y además existen diferencias entre el patrón de inmunoglobulinas del líquido cefalorraquídeo (*LCR*) y del suero, debido quizás a la producción local de anticuerpos dentro del cerebro (Wilms & Arcos, 1977).

El principal medio de defensa inmunitario presente en los cerdos infectados con cisticercosis es la producción de inmunoglobulinas (Ccama, 2001). La IgG está presente en las cerdas gestantes con cisticercosis y en sus crías, con altos niveles en el suero (88%) y en el calostro (80%) a diferencia de la IgM e IgA que son de bajo nivel (Ccama, 2001). El único medio para la transferencia de anticuerpos de la madre hacia los lechones es el calostro, después del cual, se van a encontrar anticuerpos anti-cisticerco en el suero de los lechones

(González *et al.*, 1999b). Otros estudios indican que la IgG también puede ser detectada en el suero, líquido cefalorraquídeo (LCR) y la saliva de pacientes que presentan neurocisticercosis (Ccama, 2001).

El hospedero va desarrollar una inmunidad tardía luego de que las oncósferas se establezcan en la musculatura y desarrollen los metacestodos, generando una inmunidad a la reinfección por oncósferas. Sin embargo, la respuesta en la producción de anticuerpos no impide la invasión de la larva. Estos anticuerpos desarrollados en el hospedero infectado pueden permanecer junto con los metacestodos sin afectarlos (Ccama, 2001; White, 1997).

Los anticuerpos y complemento del hospedador afectan únicamente a las oncósferas en otros tipos de tenias (*Taenia taeniaformis*, *Taenia ovis* y *Taenia hydatigena*); observándose que si la respuesta inmune del hospedero es más lenta que el mecanismo evasivo del parásito, no será capaz de destruir al metacestodo establecido (Ccama, 2001). Se concluye que estos anticuerpos van a destruir sólo a las larvas en formación y no afectan a los metacestodos, pero pueden observarse algunas alteraciones graves cuando lleguen a desarrollarse a una tenia adulta (Sciutto *et al.*, 2000; White, 1997). Hay una correlación directa entre la presencia de anticuerpos con la intensidad de infección de los cisticercos y la viabilidad del parásito; observándose rara o nula respuesta inmune ante la presencia de cisticercos calcificados (Murrell, 2005).

2.9.3 Mecanismos de evasión inmunitaria por *Taenia solium*

Los aspectos inmunológicos relacionados a *T. solium* han sido estudiados durante los últimos años debido a la importancia que implica definir los sucesos que ocurren durante la infección y el establecimiento del parásito (Chavarría & Sciutto, 2006). El ciclo natural del parásito incluye la infección de la musculatura de los cerdos con la fase larvaria de la tenia, y del intestino humano con la tenia adulta (Chavarría & Sciutto, 2006). La propagación y establecimiento del parásito va depender de mecanismos de evasión o modulación de la respuesta inmune del hospedador (Evans *et al.*, 1999). De este modo, el resultado de la interacción parásito–hospedador puede culminar en el éxito de la infección, desarrollo de la

enfermedad, la destrucción del parásito o la contención de su patogenicidad (Chavarría & Sciutto, 2006).

El metacestodo de *T. solium* presenta un complejo y diverso grupo de antígenos, que van a contribuir con la diversidad de patrones de respuesta inmunitaria (Ramos–Kuri *et al.*, 1992). La presencia del antígeno B, una paramiosina con propiedades semejantes a la fibronectina le permite asociarse con el colágeno de los tejidos del cerdo y del humano (Plancarte *et al.*, 1983). Además, otros estudios para evaluar la secreción de proteasas por parte de los cisticercos mediante extractos liofilizados de *T. solium*, indican que los metacestodos usarían a la inmunoglobulina G como sustrato (Molinari *et al.*, 1993).

Se han descrito varios mecanismos regulatorios de la respuesta inmune por parte del metacestodo. El secuestro del mismo en lugares inmunológicamente privilegiados como el cerebro y ojos es una de las estrategias mejor conocidas (Fabry *et al.*, 1994). En la cisticercosis humana localizada en el cerebro se observa una interesante interacción entre el sistema nervioso y el sistema inmune debido a la presencia de la barrera hematoencefálica, la mayor tasa de expresión inducible de moléculas de histocompatibilidad clase I y II; y la presencia de células especializadas con función inmunológica ejecutora (Fabry *et al.*, 1994). Asimismo, diversos estudios de quimioterapia experimental en cerdos demostró que los parásitos alojados en el cerebro no se ven afectados por tratamiento con drogas cestícidas (González *et al.*, 1995).

Otro de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune utilizados por *T. solium* es el enmascaramiento inmunológico. Se ha demostrado la presencia de IgG, IgM, IgA e IgE sobre la superficie de quistes obtenidos de pacientes con NCC y de cerdos infectados con cisticercos. Parece que el mecanismo de enmascaramiento se debe a la presencia de receptores Fc (fracción cristalizable) en la superficie de los quistes, lo cual va tener un papel importante en el proceso de endocitosis, y de este modo va evitar que el quiste sea reconocido por el sistema inmunológico (Mandujano *et al.*, 1990; Kalinna & McManus, 1993).

2.9.4 Primeros ensayos de vacunación contra *Taenia solium*

Los primeros ensayos de vacunación desarrollados han indicado que es posible brindar protección a los cerdos mediante el uso de extractos parasitarios como fuente antigénica (Molinari *et al.*, 1993). Otros investigadores utilizaron antígenos de excreción/secreción como inmunógenos y demostraron un 94% en la reducción de infección en cerdos vacunados comparados a los controles sin vacunar (Pathak & Gaur, 1990). Por otro lado, en México han desarrollado una vacuna sintética mediante péptidos antigénicos de la *Taenia crassiceps* del roedor (Sciutto *et al.*, 2002). Los estudios posteriores mediante el uso de esta vacuna han reportado resultados variables en campo.

Las proteínas contenidas en la oncósfera del huevo de *T. solium*, así como en casi todos los cestodos de la familia Taenidae, son conocidas por ser una fuente de antígenos protectores (Pathak & Gaur, 1990). Diversos estudios han demostrado que las oncósferas de *Taenia hydatigena* y *Taenia ovis* estimulan una respuesta protectora en ovinos (Gemmell *et al.*, 1969). La vacuna recombinante desarrollada contra *Taenia ovis* fue la primera vacuna eficaz y reconocida contra una enfermedad parasitaria y ha sido considerada como un valioso modelo para el desarrollo de vacunas contra enfermedades parasitarias (Lightowers *et al.*, 1996).

La vacunación en cerdos debería realizarse a temprana edad. Sin embargo, esta recomendación no considera que los cerdos a temprana edad podrían ser incapaces de montar una respuesta inmune adecuada, debido a la inmadurez de su sistema inmune. Por otro lado, también puede haber una respuesta inmune inadecuada por la inhibición de los anticuerpos maternos, que pueden persistir hasta los 2 meses de edad (González *et al.*, 1999b).

2.9.5 Uso de la vacuna recombinante TSOL18 contra Cisticercosis Porcina

En los últimos años se ha producido el desarrollo de las vacunas recombinantes TSOL18 y TSOL45. Su eficacia ha sido comprobada en estudios controlados en Perú, México y Camerún, mostrando que la vacunación es una herramienta capaz de prevenir la

infección de los cerdos contra *T. solium*, con un alto nivel de protección, 99.98% para TSOL18 y 98.6% para TSOL45 (González *et al.*, 2005).

El antígeno TSOL18 cumple la función de proteger a la oncósfera durante la penetración de la mucosa intestinal para que pueda llegar a establecerse en la musculatura esquelética (Martínez-Ocaña *et al.*, 2011). Debido a ello, una respuesta inmune específica dirigida contra esta proteína puede lograr que el parásito sea incapaz de sobrevivir y establecerse en su hospedador (Gauci *et al.*, 2006). Además la secuencia que codifica al gen de TSOL18 está bien conservada entre poblaciones de tenias de diferentes áreas geográficas, ya que tienen como base al gen de citocromo oxidasa subunidad I (COX1) (Gauci *et al.*, 2006). Adicionalmente la vacuna TSOL18 es efectiva contra oncósferas en fase de migración hacia el tejido donde se van a implantar, pero no es efectiva contra metacestodos que ya se hayan establecido en el músculo o cerebro antes de recibir la vacuna (Lightowlers, 2010).

El péptido TSOL18 tiene un bajo nivel de expresión y purificación a gran escala, lo cual es un gran limitante para su uso en la generación de vacunas recombinantes (Xuepeng *et al.*, 2008). Esto ocurre principalmente con sistemas de expresión procariota como *Escherichia coli*, debido a que la proteína expresada no presenta modificaciones post-traduccionales ni glicosilaciones (Lightowlers, 2010). Debido a esto se han utilizado la expresión del péptido mediante sistemas de expresión eucariota como *Pichia pastoris*, lo que permitirá una expresión más simple y una purificación a gran escala (Xuepeng *et al.*, 2008).

En el año 2016, se obtuvo la licencia para la comercialización de una nueva vacuna generada por Indian Immunological Limited (IIL) y GALVmed, basada en los estudios realizados por el investigador Marshall Lightowlers de la Universidad de Melbourne. La vacuna contiene 150ug del péptido TSOL18 expresado en *Pichia pastoris* con un adyuvante mineral. Esta vacuna denominada Cysvax® impide el establecimiento de los cisticercos en la musculatura de los cerdos interrumpiendo, de este modo, el ciclo biológico del parásito y evitando el desarrollo de la tenia en el humano. Actualmente la vacuna tiene licencia para su distribución en la India, Tanzania, Uganda, Kenya, Nepal, Filipinas Tailandia y Sri Lanka (OMS, 2018).

2.9.5.1 Estructura de la proteína recombinante

Las vacunas recombinantes de *T. solium* se han desarrollado mediante la identificación y expresión en la bacteria *E. coli*, de antígenos derivados de la oncósfera (Lightowlers, 2010). Las proteínas y los genes que codifican estas vacunas tienen características similares a otras vacunas contra antígenos de cestodos, incluyendo la presencia de una secuencia señal secretora y una o dos copias de un dominio de fibronectina III (FnIII), cada una codificada por los exones separados dentro del gen asociado (Lightowlers *et al.*, 2003b). En las especies de *Taenia sp.* hay una familia de genes de adhesión que poseen regiones FnIII y poseen un alto nivel de conservación en la estructura genómica de los genes que codifican diversos antígenos que pertenecen a cada uno de los grupos homólogos de los diversos parásitos tipo tenia (Lightowlers *et al.*, 2003b; González *et al.*, 2007).

Los dominios FnIII encontrados en proteínas pertenecientes a cestodos forman el dominio más grande y más común de los sub-dominios de fibronectina (Leahy *et al.*, 1996). Estos dominios se observan en el antígeno de la oncósfera de *T. solium*, el cual tiene una estructura de dos capas de hoja beta terciaria (Lightowlers *et al.*, 2003a). Se ha demostrado que algunas de estas proteínas que contienen dominios FnIII actúan como adhesinas; por lo tanto, podrían estar involucrados en la fijación del parásito a la pared intestinal (Lightowlers *et al.*, 2003a; González *et al.*, 2007).

2.9.5.2 Adyuvantes

El adyuvante QuilA ha sido el más utilizado durante los diferentes ensayos de la vacuna generada con el péptido TSOL18 en pruebas de campo. QuilA es una mezcla compleja de saponinas extraídas del organismo *Quillaja saponaria Molina* (Kensil, 1996). Se trata de un extracto soluble parcialmente purificado. Probablemente su actividad adyuvante está mediada por el grupo aldehído de las saponinas que lo componen, lo que permite la formación de un cambio de bases con los grupos amino de receptores de Células T co-estimuladores (Kensil, 1996). Algunas consideraciones descritas para el uso de QuilA

han sido la toxicidad, que principalmente depende de la ruta de administración (más tóxico cuando se administra por vía venosa), así como su actividad hemolítica (Sun *et al.*, 2009). A pesar de ello, es un agente adyuvante ampliamente utilizado debido a los efectos potenciadores que ocasiona en las vacunas.

El adyuvante ISA206V es una emulsión, la cual se define como la dispersión de un líquido llamado fase dispersa en un segundo líquido llamado fase continua, los cuales no van a mezclarse homogéneamente. En este caso las fases son agua/aceite mineral/agua y para poder estabilizarlo, se les adicionan sustancias surfactantes. Este adyuvante va permitir una absorción lenta, protege al antígeno de una degradación rápida y estimula la respuesta inmune humoral (Aucouturier *et al.*, 2001). Este tipo de adyuvantes son bien tolerados y van a inducir una reacción inflamatoria leve y transitoria en el sitio de aplicación a medida que son metabolizados y eliminados del organismo, por estos motivos se considera una buena alternativa para la generación de vacunas de uso en animales (Aucouturier *et al.*, 2001).

2.9.5.3 Perspectivas del uso de vacunas recombinantes contra Cisticercosis Porcina

La eficacia del uso de la vacuna recombinante TSOL18 expresada en procariotas ha sido evaluada en diferentes estudios controlados realizados en México, Honduras, Perú y Camerún (Gauci *et al.*, 2006; Lightowers, 2010; Assana *et al.*, 2013). El estudio de evaluación en campo de la vacuna TSOL18 en una zona endémica del Perú (Jayashi *et al.*, 2012), demostró altos niveles de protección en cerdos desafiados en condiciones naturales lo que demuestra su aplicabilidad en programas de control.

Por otro lado, la investigación de Assana *et al.* (2010) indicó que la vacunación contra cisticercosis porcina conjuntamente con el tratamiento con Oxfenzadol en la población porcina, puede eliminar completamente la fuente de infección, evitando el desarrollo de tenias en el humano, lo que constituye una estrategia prometedora para el control de la enfermedad (Lightowers, 2010).

Durante los últimos años se han utilizado otros sistemas de expresión para la proteína como es el caso de *Pichia pastoris* (desarrollado por Indian Immunologicals Limited) que es una levadura, que a diferencia del sistema de expresión en procariotas realiza las modificaciones post-traduccionales y los procesos de glicosilación que permiten obtener una proteína con mayor capacidad antigénica; lo que constituiría un paso adelante en el desarrollo de una vacuna efectiva para el control de la cisticercosis porcina (Xuepeng *et al.*, 2008). Es por ello que resulta importante evaluar las diferentes estrategias de vacunación y determinar la combinación más óptima de vacuna y adyuvante de acuerdo al programa requerido para definir la mejor estrategia de control.

En el 2016, Chile *et al.* realizaron el cultivo y la evaluación de la respuesta inmunológica *in vitro* de la forma postoncosférica (PO) de la *T. solium*. Observándose que las proteínas antigénicas expresadas por las formas PO también son expresadas por la oncósfera y los cisticercos, pero en mayor cantidad. Evaluar estos estadios tempranos puede permitir la identificación de moléculas específicas relacionadas al parásito y aumentar la disponibilidad de altas cantidades de antígenos, especialmente proteínas y antígenos expresados durante la fase inicial de la formación del cisticerco, los cuales son muy difíciles de estudiar en el hospedero intermediario *in vivo*. Estos estudios dan alcances específicos de los mecanismos de evasión inmunológica de la oncósfera a la respuesta inmune del hospedero durante el desarrollo del cisticerco y van a permitir diferenciar las proteínas que pueden ser utilizadas para la generación de vacunas específicas en mayor cantidad.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR Y FECHA DE ESTUDIO

El estudio se realizó durante los meses de Abril a Septiembre de 2012, en dos localizaciones distintas. La crianza, vacunación y posterior desafío de los cerdos se realizó en las instalaciones de la granja ubicada a la altura del kilómetro 80 de la Panamericana Norte (provincia de Chancay). La eutanasia, necropsia y evaluación de la canal se realizó en las instalaciones de experimentación animal del Laboratorio de Epidemiología y Economía Veterinaria de la UNMSM.

3.2 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los procedimientos realizados fueron aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia como parte del Protocolo de Investigación titulado: “Estudios de Eficacia, Seguridad e Inmunidad Materna para la vacuna TSOL18 contra Cisticercosis Porcina”, con el código de inscripción 59709 (Anexo 1).

3.3 ANIMALES

Se seleccionaron cerdos de línea comercial (cruce Pietrain/Landrace) de ocho semanas de edad, provenientes de marranas de una granja comercial (ubicada en Lima) seronegativas a cisticercosis porcina mediante la Prueba de EITB.

Los animales fueron adquiridos posteriormente a la fase de destete, con la finalidad de evitar el estrés y el desarrollo de cuadros clínicos. Como criterio de inclusión en la población muestral se consideraron aquellos lechones que resultaran seronegativos a la Prueba de EITB para cisticercosis, además se excluyeron aquellos lechones que se encontraran clínicamente enfermos durante la toma de muestra inicial (Figura 7).



Figura 7. Toma de muestra de sangre en lechones. Toma de muestra inicial para inclusión de animales en los grupos de experimentación.

3.4 TAMAÑO DE GRUPO EXPERIMENTAL

El tamaño de cada grupo de experimentación fue determinado mediante la Prueba de Contraste para la comparación de proporciones, utilizando la siguiente fórmula:

$$n = \left(\frac{z_{\alpha} \sqrt{2p(1-p)} + z_{\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}}{p_1 - p_2} \right)^2$$

Los valores utilizados son:

- Proporción de animales infectados (Grupo control) $\rightarrow p_1 = 80\%$
- Proporción de animales infectados (Grupo vacunal) $\rightarrow p_2 = 10\%$
- Proporción media: $[(p_1 + p_2)/2] \rightarrow p = 45\%$
- Nivel de confianza: 95%, entonces el valor de $\alpha = 5\% \rightarrow Z_{\alpha/2} = 1.96$ (contraste bilateral)
- Potencia de la Prueba: 80%, entonces el valor de $\beta = 20\% \rightarrow Z_{\beta} = 0.84$

Se obtuvo el valor mínimo de 7 animales por cada grupo. Se tomaron 50 animales en total, pero un animal no llegó a cumplir los criterios de inclusión del estudio y fue retirado.

3.5 DISEÑO DE ESTUDIO

3.5.1 Tipo de estudio

El presente estudio corresponde a un ensayo clínico aleatorio en ciego.

3.5.2 Traslado de los cerdos a la granja experimental

Luego de la selección de las unidades experimentales, 49 lechones de aproximadamente 10 semanas de edad (23 machos y 26 hembras) fueron trasladados a las instalaciones de la granja experimental, identificados mediante aretado auricular y distribuidos en los corrales de acondicionamiento, por un período de cinco días. Se les suministraron dietas de transición y agua *ad-libitum*. El cronograma de las actividades realizadas durante el desarrollo de la fase experimental puede ser revisado en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Cronograma de actividades realizadas durante la fase experimental

DÍA	ACTIVIDAD
-5	Llegada de los cerdos 1° Sangrado
0	1° Inmunización (Grupos T2, T3, T4)

9	2° Sangrado
23	2° Inmunización (Grupos T1, T2, T3, T4) 3° Sangrado
36	4° Sangrado
37	Desafío con un proglótido grávido de <i>T. solium</i>
50	5° Sangrado
64	6° Sangrado
78	7° Sangrado
92	8° Sangrado
107	9° Sangrado
121	Traslado, eutanasia y necropsia de los animales

3.5.3 Vacunas

Las vacunas administradas durante el estudio fueron brindadas por GALVmed en un proyecto conjunto con el Grupo de Trabajo de Cisticercosis en el Perú. Los cerdos fueron inmunizados con dos tipos de vacunas: 1. IILTSOL18, es una vacuna recombinante desarrollada por la Indian Immunological Limited (IIL), en el cual el antígeno TSOL18 fue expresado en la levadura *Pichia pastoris*. Esta vacuna contiene valores mayores a 150ug de TSOL18, la cual fue administrada con dos tipos distintos de adyuvantes. 2. UMTSOL18, vacuna recombinante desarrollada por la Universidad de Melbourne, en la cual el antígeno TSOL18 ha sido expresado en la bacteria *Escherichia coli*. Esta vacuna tiene una formulación de 120ug TSOL18 con 30mg de adyuvante QuilA y 7.2mg Trehalosa,

3.5.4 Grupos de Tratamiento

Los animales fueron distribuidos de manera aleatoria para conformar 5 grupos de tratamiento (n=10), en los cuales fueron evaluados asociaciones de vacunas, adyuvantes y dosis de administración, los cuales son presentados en detalle en el Cuadro 2. De acuerdo a la distribución observada, el tratamiento T3 estuvo conformado por 9 cerdos, debido a la presencia de un cerdo positivo a 1 banda mediante la Prueba de EITB, por lo que fue excluido del estudio.

Cuadro 2. Distribución de cerdos en cada uno de los tratamientos con las vacunas recombinantes IILTSOL18 y UMTSOL18, 2012.

<i>Tratamiento</i>	<i>Número de animales</i>	<i>Vacuna utilizada</i>	<i>Adyuvante</i>	<i>Número de dosis</i>	<i>Volumen de dosis</i>	<i>Días de vacunación</i>
T1	10	IIL TSOL18	ISA206V	1	1 ml	23
T2	10	UM TSOL18	Quil A	2	1 ml	0 – 23
T3	9	IIL TSOL18	Quil A	2	1 ml	0 – 23
T4	10	IIL TSOL18	ISA206V	2	1 ml	0 – 23
T5	10	Control (solución salina)			1 ml	0 – 23

T1: IILTSOL18+ISA206V – 1 Dosis. T2: UMTSOL18+QuilA – 2 Dosis. T3: IILTSOL18+QuilA – 2 Dosis. T4: IILTSOL18+ISA206V – 2Dosis. T5: Control. El primer día de vacunación es tomado como el día 0 de estudio.

El cuadro anterior describe los protocolos de vacunación utilizados para cada uno de los tratamientos. La primera ronda de vacunación fue realizada al día cero de inicio del experimento (para los tratamientos T2, T3 T4 y el control), mientras que la segunda ronda de vacunación (para todos los grupos) se realizó al día 23. Las vacunas fueron trasladadas a los corrales bajo las condiciones adecuadas de transporte y bajo cadena de frío (4°C) en coolers herméticos.

La vacunación fue realizada mediante el uso de una jeringa de 3ml conectada a una aguja número 21½, de uso individual y bajo condiciones de asepsia. El sitio de aplicación fue a nivel de la tabla del cuello vía intramuscular profunda, en el cual se introdujo la aguja conectada a la jeringa en ángulo recto y se inoculó 1ml de la vacuna para cada tratamiento (Figura 8). La primera inmunización fue realizada en el lado derecho y la segunda, en el lado izquierdo. Las posibles reacciones adversas causadas por la vacuna (fiebre, decaimiento, entre otros.) fueron monitoreadas durante el período post-vacunal.

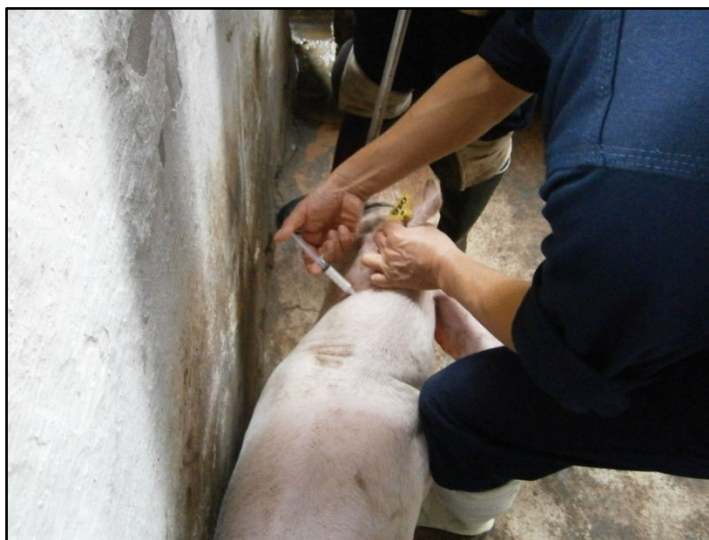


Figura 8. Inmunización de los animales con la vacuna IILTSOL18 o UMTSOL18. Se inocularon 1ml de la vacuna en el lado izquierdo de la tabla del cuello.

3.5.5 Monitoreo serológico de los cerdos

El monitoreo serológico de los cerdos fue realizado mediante tomas de muestra de sangre. El sangrado fue realizado mediante punción de la vena cava anterior utilizando tubos al vacío sin anticoagulante. Se realizó la colecta aproximadamente 8ml de sangre, para lo cual los animales fueron inmovilizados con la ayuda del lazo colocado en el maxilar (Figura 9). La toma de muestra de sangre fue realizada cada dos semanas durante todo el desarrollo del estudio.

Las muestras de sangre fueron rotuladas con el número de identificación de cada individuo y la fecha. Luego de la extracción fueron refrigeradas y procesadas mediante centrifugación a 3200rpm durante siete minutos. El sobrenadante fue transferido a viales herméticos de 1ml en 3 juegos (A, B y C). Finalmente, las muestras fueron codificadas y almacenadas en congelación (-20°C) hasta su posterior procesamiento.



Figura 9. Sangrado de los animales. Toma de muestra de sangre mediante punción de la vena cava. Cada muestra tomada fue rotulada de inmediato.

3.5.6 ELISA indirecto para detección de anticuerpos

Se realizó la Prueba de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG vacunales anti-TSOL18 (oncósfera) en el Laboratorio de Cisticercosis del Instituto de Ciencias Neurológicas de Lima. Los sueros negativos del muestreo realizados a los cerdos del experimento fueron utilizados como controles negativos. Además fue considerado como pool positivo los sueros de los animales del experimento a la sexta semana post-vacunación. El valor de cuantificación de anticuerpos se realizó mediante Porcentaje de Positividad (PP) el cual realiza un ajuste de los valores de densidad óptica (OD) de cada muestra problema, contra el valor del pool positivo, de tal forma que la variación interplaca se minimiza. La determinación del PP viene dado por la siguiente expresión:

$$PP = \frac{OD \text{ muestra}}{OD \text{ pool} +} \times 100$$

El procedimiento para realizar el Procedimiento del ELISA Indirecto, es descrito en el Anexo 2.

3.5.7 Desafío de los cerdos con un proglotis grávido de *Taenia solium*

El desafío de los cerdos se realizó al día 37 del estudio (dos semanas después de la segunda inmunización). Para el desafío se utilizaron proglotis grávidos de *T. solium*, los cuales fueron brindados por el Laboratorio de Cisticercosis del Instituto de Ciencias Neurológicas de Lima. La identificación y confirmación de especie de tenia (entre *T. saginata* y *T. solium*) se realizó mediante identificación del número de ramas uterinas características. El desafío en los cerdos se realizó bajo estrictas normas de bioseguridad, para lo cual los operarios encargados de la infección llevaron puesto indumentaria adecuada para evitar el contacto con material infectivo.

Los cerdos fueron desafiados mediante la ingestión oral de un proglotis grávido. Para ello, los animales fueron previamente entrenados una semana mediante consumo de bolos de plátano y afrecho. El día de infección se les administraron bolos de plátano y afrecho conteniendo los proglotis infectivos (Figura 10). Un profesional verificó que los cerdos ingirieran la totalidad del proglotis, con la finalidad de evitar una sub-dosis.



Figura 10. Desafío de los cerdos con un proglótido grávido de *Taenia solium*. A. El animal es restringido mediante una jaula de metal. B. Un profesional administra el bolo infectivo.

3.5.8 Traslado de los cerdos a las instalaciones de la FMV-UNMSM

A las doce semanas posteriores al desafío, los animales fueron trasladados hacia las instalaciones de experimentación animal del Laboratorio de Epidemiología y Economía Veterinaria de la FMV-UNMSM. Para ello, se realizaron dos rondas de movilización de los cerdos en camiones. Los camiones fueron acoplados para evitar el estrés de los animales durante el transporte.

3.5.9 Eutanasia, necropsia de los cerdos y evaluación de la canal

El beneficio de los cerdos se realizó a la semana diecisiete y dieciocho del estudio. Los cerdos fueron sacrificados periódicamente en número de seis animales por día. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de Clorhidrato de Xylacina y Ketamina (2mg/kg y 15mg/kg respectivamente) aplicados por vía intramuscular. Posteriormente fue administrada una sobredosis del barbitúrico Pentobarbital sódico (120mg/kg) por vía intravenosa (Figura 11). La muerte de los cerdos fue confirmada mediante auscultación y evaluación del pulso.



Figura 11. Eutanasia de los animales A. Administración de Pentobarbital sódico endovenoso. B. Troceado de la canal porcina.

Se realizó un corte a la altura del cuello para el desangrado de los cerdos. Luego se procedió a retirar la piel y se realizó el trozado de la canal de acuerdo al siguiente esquema (Cuadro 3):

Cuadro 3. Segmentos de la canal porcina para la evaluación de la presencia de quistes de *cysticercus cellulosae*

<i>Segmento</i>	<i>Ubicación y separación</i>
Pierna derecha e izquierda	A nivel de la articulación coxo-femoral
Brazo derecho e izquierdo	A nivel de los músculos pectorales y espalda
Costillar derecho e izquierdo	Se separa la unión esternocostal y la unión de las costillas con las vértebras
Cuello/columna	Desde el Atlas hasta L3
Sacro	Desde L3 hasta el nacimiento de la primera vértebra coccígea
Cerebro, corazón y lengua	Individual

El diagnóstico de quistes se realizó mediante la evaluación minuciosa de la canal con cortes finos realizados con bisturí (Figura 12). El examen fue realizado en ciego y se contabilizaron todos los quistes visualizados. Los quistes encontrados fueron clasificados en base a su apariencia en: quistes sanos (presencia de escólex y líquido opalescente) y quistes degenerados (estructura caseosa blanca y ausencia de escólex).

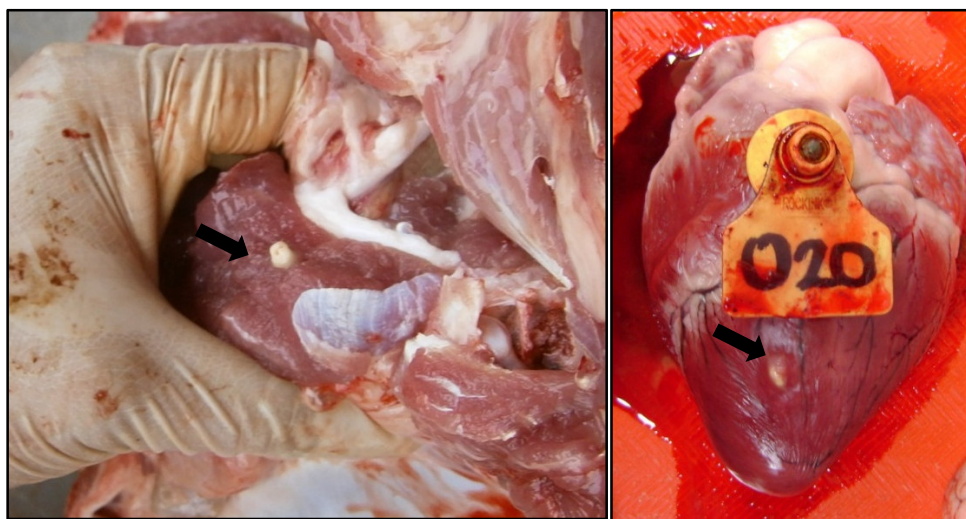


Figura 12: Quistes degenerados de *cysticercus cellulosae* visualizados durante la evaluación de la canal porcina.

3.6 ORGANIZACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de la evaluación de las canales (número de quistes sanos y quistes degenerados), los resultados de la Prueba de ELISA indirecta (PP+ y resultados positivo o negativo) obtenidos al sacrificio fueron organizados para cada tratamiento y sexo de cerdos como base de datos en una hoja de cálculo del Programa Microsoft Excel y posteriormente analizados en el programa estadístico Stata 12.0 (Stata Corp, College Station TX).

3.7 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Se presentaron los resultados de carga parasitaria (número de quistes sanos y degenerados) mediante histogramas de distribución y estadísticos descriptivos (promedio, desviación estándar y mediana). A partir de los resultados de carga se generó la variable Presencia de quistes (presencia/ausencia), la cual fue presentada como frecuencia en un cuadro de contingencia. En relación a los resultados de ELISA, se obtuvieron datos cuantitativos en función de los valores de PP+ y resultados cualitativos (positivo/negativo a la presencia de anticuerpos) mediante comparación con un pool positivo y pool negativo.

Las diferencias estadísticas en relación a carga parasitaria y presencia de quistes entre tratamientos fueron comparadas mediante los análisis de Kruskal Wallis. Los valores PP+ y de carga parasitaria de cada cerdo fueron analizados mediante la Prueba no paramétrica de Shapiro-Wilk ($n < 50$) para verificar la distribución de los datos. Ambas variables presentaron una distribución no normal. Debido a ello, las diferencias en los valores de PP+ entre tratamientos fueron analizados mediante el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis. Todos los análisis fueron realizados con un nivel de significancia de 0.05.

IV. RESULTADOS

4.1 CARGA PARASITARIA

Los resultados generales de la carga parasitaria obtenidos mediante la evaluación de la canal son presentados en el Anexo 3. Se realizó un Histograma de distribución para quistes sanos, quistes degenerados y quistes totales en función a los grupos de tratamiento (Figura 13), en el cual se observó que solo el grupo T1 presentaba quistes sanos, el grupo T3 no presentó ningún quiste y además se puede visualizar que el mayor número de quistes parasitarios totales se presentaron en el grupo T1 (n=116) y Control (n=66).

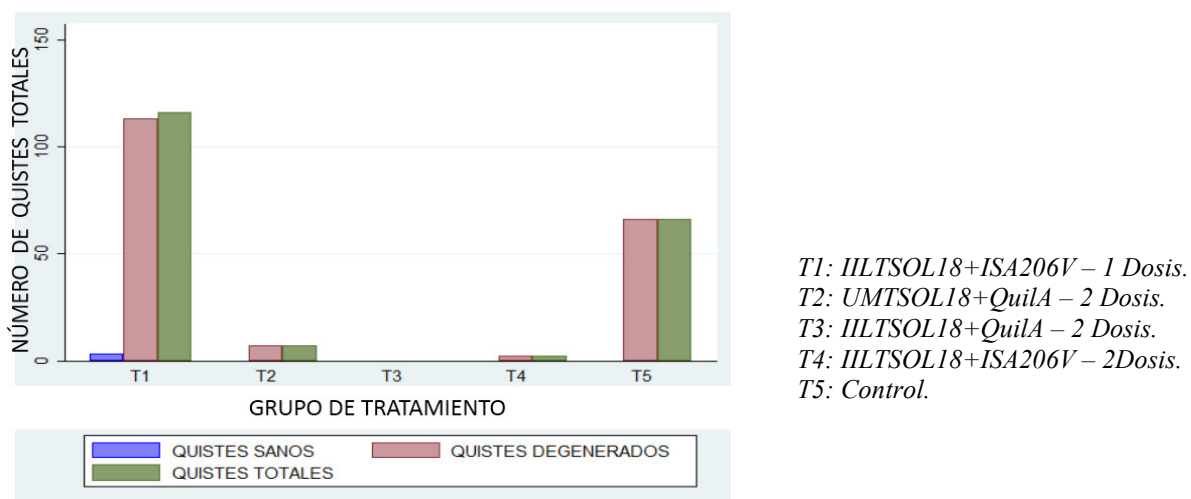


Figura 13: Histograma de distribución de cargas parasitarias (*cysticercus cellulosae*) en función a los grupos de tratamiento. Se observa ausencia de quistes en el grupo T3, y presencia de quistes sanos en el grupo T1. Gráfico obtenido del programa estadístico STATA 12.0 (Stata Corp.).

Se realizó un análisis estadístico descriptivo de los valores de carga parasitaria obtenida (Cuadro 4) en el cual se observa que solo un cerdo perteneciente al grupo T1 presentaba quistes sanos (el cual presentó 35 quistes totales), por otro lado la distribución de carga parasitaria total (quistes sanos + degenerados) demostró mayores rangos de dispersión en función a la mediana, en los animales del grupo T1, con una desviación estándar (D.E) de 18.6, seguido por los animales del grupo control o T5 (D.E = 12.1); mientras que en el grupo T3 ningún animal presentó quistes a la necropsia y en los grupos T2 y T4 el valor promedio de quistes fue bajo (D.E = 0.1 y 0.2 respectivamente).

Cuadro 4. Resultados estadísticos descriptivos de carga parasitaria (quistes de *cysticercus cellulosae*) por cada tratamiento

<i>Tratamientos</i>	<i>Tamaño grupo</i>	<i>Carga parasitaria</i>		
		<i>Quistes viables</i>	<i>Quistes degenerados</i>	<i>Quistes totales</i>
T1				
Promedio	10	0.3	11.3	11.6
Mediana		0	0	0
T2				
Promedio	10	0	0.7	0.7
Mediana		0	0	0
T3				
Promedio	9	0	0	0
Mediana		0	0	0
T4				
Promedio	10	0	0.2	0.2
Mediana		0	0	0
T5				
Promedio	10	0	6.6	6.6
Mediana		0	1	1

T1: IILTSOL18+ISA206V – 1 Dosis. T2: UMTSOL18+QuilA – 2 Dosis. T3: IILTSOL18+QuilA – 2 Dosis. T4: IILTSOL18+ISA206V – 2Dosis. T5: Control.

De forma similar, se realizó una evaluación de la frecuencia de animales positivos con diagnóstico de quistes totales por grupo de tratamiento (Cuadro 5). El porcentaje de animales con quistes totales fue más alto para los cerdos del grupo control (60%); no se observaron cerdos con diagnóstico de quistes totales en el grupo T3 y únicamente un cerdo de los grupos T2 y T4 presentó quistes (10% en cada grupo respectivamente).

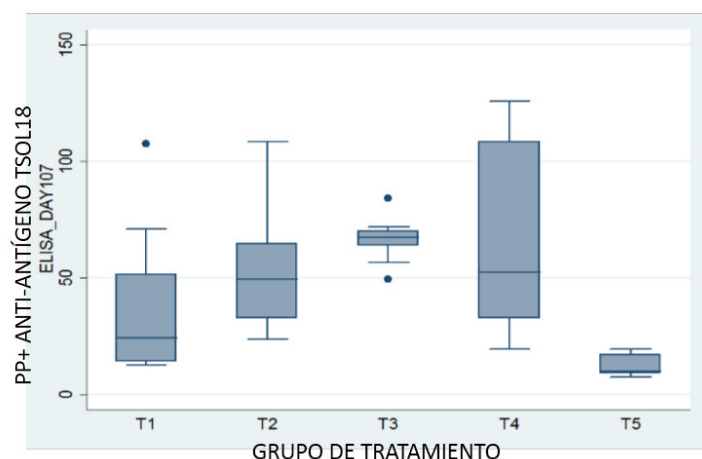
Cuadro 5. Distribución de la frecuencia de cerdos positivos con diagnóstico de quistes totales (*cysticercus cellulosae*) por grupo de tratamiento

Tratamiento	Tamaño grupo	Diagnóstico de quistes totales (sanos+degenerados)			
		Positivos		Negativos	
		animales	%	Animales	%
T1	10	4	40%	6	60%
T2	10	1	10%	9	90%
T3	9	0	0	9	100%
T4	10	1	10%	9	90%
T5	10	6	60%	4	40%

T1: IILTSOL18+ISA206V – 1 Dosis. T2: UMTSOL18+QuilA – 2 Dosis. T3: IILTSOL18+QuilA – 2 Dosis. T4: IILTSOL18+ISA206V – 2Dosis. T5: Control.

4.2 RESULTADOS DE ELISA INDIRECTO

Los resultados de la Prueba de ELISA en función del valor de porcentaje de positividad (PP+) de los sueros tomados durante el día 107 del estudio en los cerdos de cada uno de los grupos experimentales son presentados en la Figura 14 y el Cuadro 6. Se puede apreciar que los valores más altos de anticuerpos (en función de las medianas del PP+) se encontraron en los cerdos del grupo T3 (valor mediana 67.3) mientras que los valores más bajos de positividad se encontraron en los cerdos del grupo T1 (valor mediana 14.7).



T1: IILTSOL18+ISA206V – 1 Dosis.
T2: UMTSOL18+QuilA – 2 Dosis.
T3: IILTSOL18+QuilA – 2 Dosis.
T4: IILTSOL18+ISA206V – 2Dosis.
T5: Control.

Figura 14. Distribución de las medianas de los valores de porcentaje de positividad (PP+) en cada grupo de tratamiento. Gráfico obtenido mediante el programa estadístico STATA 12.0 (Stata Corp).

Cuadro 6. Resultados estadísticos descriptivos de la evaluación de los valores de porcentaje de positividad (PP+) por tratamientos

<i>Tratamiento</i>	<i>Valores de porcentaje de positividad (PP+)</i>				
	T1	T2	T3	T4	T5
Tamaño grupo	10	10	9	10	10
Promedio	36.9	51.9	66.3	65.9	12.1
Mediana	24.2	49.3	67.3	52.4	14.7
Desv. Est.	31.4	25.5	9.7	41.2	4.6
Mínimo	12.6	23.7	49.2	19.4	7.3
Máximo	107.3	108.2	83.9	125.6	19.5

T1: IILTSOL18+ISA206V – 1 Dosis. T2: UMTSOL18+QuilA – 2 Dosis. T3: IILTSOL18+QuilA – 2 Dosis. T4: IILTSOL18+ISA206V – 2Dosis. T5: Control.

Debido a que los valores de PP+ no constituyeron datos de distribución normal, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para determinar diferencias significativas de los valores de PP+ entre grupos experimentales. Los resultados del análisis de comparaciones múltiples demostraron diferencias estadísticas significativas entre el grupo control en función a los otros grupos vacunales T1, T2, T3 y T4 ($p=0.0102$, $p=0.0002$, $p=0.0002$ y $p=0.0002$ respectivamente) y en el grupo T1 en función de los grupos T3, T4 y T5 ($p=0.0222$, $p=0.0494$ y $p=0.0102$ respectivamente).

A partir de los valores de PP+, mediante comparaciones con valores de OD de controles positivos y negativos se determinó la frecuencia de animales positivos a la presencia de anticuerpos (variable binaria) (Cuadro 7). Asimismo, las frecuencias de seropositividad a anticuerpos vacunales fueron más altas en cerdos de los grupos T2 y T3 (100%), siendo los resultados generales estadísticamente significativos ($p<0.05$).

Cuadro 7. Resultados de seropositividad PP+, a anticuerpos vacunales, en cerdos vacunados

<i>Tratamiento</i>	<i>Tamaño grupo</i>	<i>Resultados de seropositividad a anticuerpos vacunales</i>			
		<i>Positivos</i>		<i>Negativos</i>	
		<i>animales</i>	<i>%</i>	<i>animales</i>	<i>%</i>
T1	10	7	70%	3	30%
T2	10	10	100%	0	0
T3	9	10	100%	0	0
T4	10	9	90%	1	10%
T5	10	3	30%	7	70%

T1: IILTSOL18+ISA206V – 1 Dosis. T2: UMTSOL18+QuilA – 2 Dosis. T3: IILTSOL18+QuilA – 2 Dosis.

T4: IILTSOL18+ISA206V – 2Dosis. T5: Control.

V. DISCUSION

La teniasis/cisticercosis ocasionada por *T. solium* aún continúa siendo una enfermedad de gran impacto de zonas rurales con crianza tradicional de porcinos de los países no desarrollados pertenecientes a Latinoamérica, África y Asia. Diferentes esfuerzos realizados para controlar la enfermedad como el uso de antiparasitarios (González *et al.*, 1996; González *et al.*, 1997) así como el desarrollo de las vacunas han demostrado que es posible controlar la enfermedad. Sin embargo, la dificultad económica para implementar sistemas de intervención mixtos en las poblaciones humana y porcina de los países pobres han sido un limitante para erradicar y/o controlar esta enfermedad (Lightowlers, 2017).

Un método potencial para el control de la cisticercosis en poblaciones porcinas es el uso de vacunas, ya que una vacuna efectiva debería ser capaz de eliminar el establecimiento de las formas larvianas del parásito en el hospedero intermediario, rompiendo de este modo, el ciclo de transmisión de *T. solium*, reduciendo o eliminando el riesgo de desarrollo de la NCC humana (Lightowlers *et al.*, 1996).

El desarrollo de vacunas recombinantes TSOL18 y TSOL45 y su eficacia han sido comprobados en diferentes ensayos clínicos, convirtiéndolas en poderosas herramientas capaces de prevenir la infección con *T. solium* en cerdos, con un alto nivel de protección, 99.98% para TSOL 18 y 98.6% para TSOL 45 (González *et al.*, 2005). No obstante, la vacunación porcina contra *T. solium* presenta algunos inconvenientes, como por ejemplo el costo de implementación de un programa de vacunación eficaz o el hecho de que la vacuna no genere protección en animales que ya presenten los cisticercos en musculatura, los cuales deben ser manejados antes de su aplicación como medida de control.

Los estudios de campo han determinado que los cerdos se infectan con los huevos de *T. solium* a muy temprana edad pero no hay una edad establecida de susceptibilidad al parásito (De Aluja *et al.*, 1996). Por otro lado, la vacunación en animales adultos resultaría ineficaz porque la vacuna no elimina quistes ya establecidos, además el uso potencial de la vacuna va ser dependiente del costo, ya que la cisticercosis porcina es una zoonosis y el principal interesado en su uso debería ser el campesino (González *et al.*, 2003).

Por todos los motivos descritos anteriormente es importante la interpretación de los resultados de este estudio así como las implicancias del mismo para la implementación de un programa de vacunas contra cisticercosis porcina. En relación a la carga parasitaria, debemos considerar como factor limitante el hecho de que no se alcanzó una alta tasa de infección deseada (visto en la falta de desarrollo de quistes sanos incluso en el grupo control). Posibles explicaciones para ello estarían en función a la capacidad infectiva de los huevos contenidos en los proglotis, debido probablemente a un largo período de tiempo de almacenamiento, fallas en el transporte de las muestras, e incluso a fallas durante el desafío experimental.

En relación a los resultados de carga parasitaria con quistes totales, se pudo apreciar que el mayor promedio de quistes totales se encontraron a nivel del grupo T1 (una sola dosis vacunal) siendo incluso mayor que los controles; adicionalmente solo este grupo presentó quistes sanos, estos resultados claramente nos indican que en situaciones naturales resultaría necesario la implementación de dos rondas vacunales para poder controlar el desarrollo de quistes ya que no se apreció ningún quiste sano en los grupos T2, T3 y T4, los cuales

recibieron dos rondas de vacunación. De hecho, un ensayo de vacunación en campo (Jayashi *et al.*, 2012) mediante el uso de vacunas recombinantes TSOL16 y TSOL18 en dos rondas de vacunación demostraron alta eficacia en el control de la transmisión de enfermedad. Ya que TSOL16 y TSOL18 son antígenos exclusivos de la oncósfera (Gaucci *et al.*, 2013) es de esperar que un cerdo vacunado no debería desarrollar quistes degenerados a la evaluación de necropsia; no obstante, los resultados obtenidos indican que el uso de dichas vacunas incrementa la aparición de cisticercos degenerados en los animales.

En los resultados también se puede apreciar claramente que la administración de dos dosis de vacunación brindan mejores resultados para el control de la enfermedad; asimismo se puede apreciar que el tratamiento más eficaz fue el grupo T3, en el cual la vacuna IILTSOL18 fue combinada con el adyuvante QuilA, a diferencia de los otros grupos de tratamiento que utilizaron el adyuvante ISA206V. Esto es debido a que QuilA es un extracto semi purificado de saponinas mientras que ISA206V se produce a partir de un aceite mineral. Estas diferencias va demostrar que QuilA, al ser un adyuvante orgánico, estimula de mejor forma al sistema inmune produciendo una respuesta más efectiva en la inducción de producción de anticuerpos. Definitivamente existe un efecto notorio en relación al uso de adyuvante en los estudios de vacunas recombinantes; ya que se ha podido observar previamente que el uso de diferentes dosis del producto QuilA es responsable de estimular de forma diferencial (diferentes tasas) a la producción de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2 (Jayashi *et al.*, 2012).

En relación a los valores de PP+ entre los grupos experimentales se observó que los valores promedio más altos al momento de la necropsia se encontraron en los cerdos del grupo T3 (IILTSOL18+QuilA – 2 Dosis de vacunación). Estos resultados al ser comparados con otros estudios indican el potencial inmunogénico de la aplicación de dos rondas vacunales con el antígeno TSOL18, ya que en un estudio previo, animales vacunados de hasta 7 meses de edad aún presentan títulos altos de la vacuna lo cual les confiere un nivel de protección en campo (Jayashi *et al.*, 2012). Es importante notar que una ronda de vacunación en nuestro estudio no mantuvo niveles altos de anticuerpos al final del estudio, lo cual además se corrobora con un mayor número de carga parasitaria total promedio descrito anteriormente.

A partir de los resultados obtenidos podemos indicar que efectivamente dos dosis de vacunación resultan necesarias para controlar la infección con *T. solium* en los cerdos. Además se observó un mayor efecto en el esquema de vacuna en los cerdos del grupo T3 (IILTSOL18 + adyuvante QuilA– 2 Dosis de vacunación) sobre los valores de anticuerpos y el desarrollo de quistes, presentando una menor dispersión en presentación de anticuerpos en todos los animales pertenecientes a dicho tratamiento, con lo que podemos deducir que la estimulación inmunogénica es menos variable entre los individuos que recibieron este protocolo de vacunación.

VI. CONCLUSIONES

- En el estudio se encontró una eficacia de protección del 100% contra cisticercosis porcina en los animales inmunizados con la vacuna IILTSOL18 (péptido TSOL18 expresado en *Pichia pastoris*) + Adyuvante QuilA, la cual fue administrada mediante dos dosis vacunales al día 0 y 23 del estudio.
- No se observaron cisticercos sanos ni degenerados en el tratamiento con la vacuna IILTSOL18 (péptido TSOL18 expresado en *Pichia pastoris*) + adyuvante QuilA comparado a los demás tratamientos y el grupo control.
- Se obtuvieron medianas más altas para los valores de PP+ en cerdos inmunizados con la vacuna IILTSOL18 (péptido TSOL18 expresado en *Pichia pastoris*) + Adyuvante QuilA.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acha P, Szyfres B. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales III. 3ra edición. Washington DC. OPS: 171-173; 222-224 p.
2. Assana E, Kyngdon CT, Gauci CG, Geerts S, Dorny P, De Deken R, Anderson GA, Zoli A, Lightowlers MW. 2010. Elimination of *Taenia solium* transmission to pigs in a field trial of the TSOL18 vaccine in Cameroon. *Int. J. Parasitol* 40: 515–519.
3. Assana E, Lightowlers MW, Zoli AP, Geerts S. 2013. *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis in Africa: Risk factors, epidemiology and prospects for control using vaccination. *Vet Parasitol* 1:195(1-2): 14-23.
4. Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 19: 2666-2672.
5. Bern C, García HH, Evans C, González AE, Verástegui M, Tsang VCW, Gilman RH. 1999. Magnitude of the disease burden from Neurocysticercosis in developing countries. *Clinical Infectious Diseases* 29: 1203–1209.
6. Bernal, T. 1996. Evaluación de la cisticercosis porcina en el distrito de Quilcas, Huancayo. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 45p.
7. Binns RM, 1982. Organization of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig. *Veterinary immunology and immunopathology* 3: 95-146.
8. Brandt JRA, Geerts S, De Deken R, Kumar V, Ceulemans F, Brijs L, Falla N. 1992. A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of excretory/secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. *Int J Parasitol* 22: 471-477.
9. Burton J, Bogitsh CEC, Oeltmann TN. 2012. *Human Parasitology*. 4th Edition. Academic Press. United States.
10. Carhuallanqui M, Lopez T, Gonzalez A, Angulo C. 2010. Seroprevalencia de cisticercosis porcina en cuatro caseríos del distrito de Omia, Amazonas. *Rev Inv Vet Perú* 21(1): 73-79.
11. Ccama A. 2001. Persistencia de anticuerpos maternos contra cisticercosis porcina

- y su efecto sobre el EITB. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 54p.
12. Copado F, De Aluja AS, Mayagoitia L, Galindo F. 2004. The behavior of free ranging pigs in the Mexican tropics and its relationships with human faeces consumption. *Applied Animal Behaviour Science* 88(3): 243-252.
 13. Cordero Del Campillo M, Hidalgo-Argüello M. 1999. Cisticercosis. En: Cordero Del Campillo M, Rojo Vásquez F (Eds). *Parasitología Veterinaria*. España, McGraw Hill Interamericana. p493-495.
 14. Correa D, Medina-Escutia E. 1999. Host–parasite immune relationship in *Taenia solium* Taeniosis and Cysticercosis. In: García HH, Martínez SM (Eds). *Taenia solium* Taeniasis / Cysticercosis. Lima. Editorial Universo. p15–21.
 15. Curtis J, Bourne FJ. 1971. Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum and milk and the serum of young pigs. *Biochimica & biophysica acta* 236: 319-332.
 16. Chavarría A, Sciutto E. 2006. Respuesta inmune en la cisticercosis humana y porcina. En: Larralde C, De Aluja AS (Eds). *Cisticercosis: Guía para profesionales de la salud*. Fundación mexicana para la salud. p133-153.
 17. Chile N, Clark T, Arana Y, Ortega YR, Palma S, Mejia A, Angulo N, Kosek JC, Kosek M, Gómez-Puerta LA, García HH, Gavidia CM, Gilman RH, Verástegui M, Cysticercosis Working Group in Perú. 2016. *In vitro* study of *Taenia solium* Postoncospherical form. *PloS Negl Trop Dis* 10(2): 4396.
 18. D’Souza PE, Haafez Md. 1999. Detection of *Taenia solium* Cysticercosis in Pigs by ELISA with an Excretory-Secretory Antigen. *Veterinary Research Communications* 23: 293-298.
 19. De Aluja A, Villalobos ANM, Plancarte A, Rodarte LF, Hernández M, Sciutto E. 1996. Cysticercosis in pigs: Characteristics of the infection and antibody response. *Veterinary Parasitology* 76: 71–79.
 20. Del Brutto OH, García HH. 2015. *Taenia solium* Cysticercosis – the lessons of history. *J Neurol Sci* 15(2). 392-395.
 21. Del Brutto OH. 2012. Neurocysticercosis: A Review. *Scientific World Journal – Infectious Disease*. 1392–1416.

22. Díaz F, García HH, Gilman RH, González AE, Castro M, Tsang VCW, Pilcher JB, Vásquez M, Lescano M, Carcamo C, Madico G, Miranda E and The Cysticercosis Working Group in Perú. 1992. Epidemiology of taeniasis and cysticercosis in a Peruvian village. *American Journal of Epidemiology*. 875-881.
23. Espinoza B, Ruiz-Palacios G, Tovar A, Sandoval MA, Plancarte A, Flisser A. 1986. Characterization by Enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with Neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *J Clin Microbiol* 66: 536-541.
24. Evans C, The Cysticercosis Working Group in Perú. 1999. The immunology of the host-parasite relationship in *Taenia solium* cysticercosis: Implications for prevention and therapy. In: García HH, Martínez SM (Eds). *Taenia solium* Taeniasis / Cysticercosis. Lima. Editorial Universo. p25-36.
25. Fabry Z, Raine CS, Hart MN. 1994. Nervous tissue as an immune compartment: The dialect of the immune response in the CNS. *Immunology Today* 15: 218-224.
26. Flisser A, Correa D, Maravilla P. 2005. Biology of *Taenia solium*, *Taenia saginata* and *Taenia saginata asiatica*. In: Murrell KD (Ed). WHO/FAO/OIE Guidelines for the surveillance, prevention and control of Taeniasis / Cysticercosis. p1-9.
27. Flisser A, Gauci CG, Zoli A, Martínez-Ocaña J, Garza-Rodríguez A, Domínguez-Alpizar JL. 2004. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infect Immun* 72(9): 5292–5297.
28. Flisser A. 1994. Taeniasis and Cysticercosis due to *Taenia solium*. In: Sun T (Ed). *Progress in Clinical Parasitology*. New York. CRC Press. p77–116.
29. Flisser A, González D, Skhurovich M, *et al*. 1990. Praziquantel treatment of porcine brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis: Radiological, physiological and histopathological studies. *Parasitology Research* 76: 263-269.
30. Flórez AC, Pastrán SM, Vargas NS, Beltrán M, Enríquez Y, *et al*. 2013. Cisticercosis en Colombia. Estudio de seroprevalencia 2008-2010. *Acta Neurol Colomb* 29:2

31. Gabriël S, Dornya P, Mwape KE, Trevisan C, Braae, *et al.* 2017. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: The best way forward for sub-Saharan Africa? *Acta Trop* 165: 252-260.
32. García HH, González AE, Tsang VC, O'Neal SE, *et al.* 2016. Elimination of *Taenia solium* transmission in Northern Peru. *N Engl J Med* 374(24): 2335-2344.
33. García HH, González AE, Rodríguez S, Gonzálvez G, Llanos-Zavalaga F, Tsang VCW. 2010. Epidemiología y control de la cisticercosis en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 27(4): 592-597.
34. García HH, Moro PL, Schantz PM. 2007. Zoonotic helminth infections of humans: Echinococcosis, cysticercosis and fasciolosis. *Curr Opin Infect Dis.* 20: 489-494.
35. García HH, González AE, Gilman RH. 2003a. Diagnóstico, tratamiento y control de la cisticercosis por *Taenia solium*. *Rev Bol Ped* 42(3): 411-419.
36. García HH, González AE, Gavidia CM, Falcón N, Bernal T, Verástegui M, Rodríguez S, Tsang VCW, Gilman RH. 2003b. Seroincidence of porcine *T. solium* infection in the Peruvian highlands. *Prev Vet Med* 57(4): 227-236.
37. García HH, González AE, Evans CAW, The Cysticercosis Working Group in Perú. 2003c. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet* 361: 547-556.
38. García HH, González AE, Martínez MS, Gilman RH. 2001. Teniasis/cisticercosis por *Taenia solium*, un serio problema de Salud Pública en el Perú. *Informes técnicos de Investigación Epidemiológica*. Lima. MINSA. 7-50p.
39. García HH, Gilman RH, González AE, Verástegui M, and The Cysticercosis Working Group in Perú. 1999. Epidemiology of *Taenia solium* infection in Perú. In: García HH, Martínez SM (Eds.). *Taenia solium* Taeniasis/Cysticercosis. Lima. Editorial Universo. p297-305.
40. García-Noval J, Moreno E, De Matta F, Soto De Alfaro H, Fletes C, Craig PS, Allan JC. 2001. An Epidemiological study of epilepsy and epileptic seizures in two rural Guatemalan communities. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 95(2): 167-175.
41. Gauci C, Jayashi C, Lightowlers MW. 2013. Vaccine development against the *Taenia solium* parasite. *Bioengineered* 4(5): 343-347.
42. Gauci CG, Ito A, Lightowlers MW. 2006. Conservation of the vaccine antigen gene,

- TSOL18, among genetically variant isolates of *Taenia solium*. Mol. Biochem Parasitol 146: 101-104.
43. Gauci C, Lightowlers MW. 2003. Molecular cloning of genes encoding oncosphere proteins reveals conservation of modular protein structure in cestode antigens. Mol Biochem Parasitol 127: 193–208.
 44. Gemmell MA. 1969. Immunological responses of the mammalian host against tapeworm infections. Immunization of sheep against *Taenia hydatigena* and *Taenia ovis* with chemically or physically treated embryos. Experimental Parasitology 26: 58-66.
 45. Gómez-Puerta LA, García HH, González AE, Cysticercosis Working Group in Perú. 2018. Experimental porcine cysticercosis using infected beetles with *Taenia solium* eggs. Acta Tropica 183: 92-94.
 46. González AE, Gauci CG, Barber D, Gilman RH, Tsang VC, García HH, Verástegui M, Lightowlers MW. 2005. Vaccination of pigs to control human neurocysticercosis. Am J Trop Med Hyg 72: 837-839.
 47. González AE. 2002. Control of *Taenia solium* with porcine chemotherapy. In: Singh G, Prabhakar S (Eds). *Taenia solium* Cysticercosis: From Basic to Clinical Science. CABI Publishing. p431–435.
 48. González AE, Verástegui M, Noh JC, Gavidia CM, Falcon N, Bernal T, García HH, Tsang VC, Gilman RH, Wilkins PP. 1999a. Persistence of passively transferred antibodies in porcine *Taenia solium* cysticercosis. Veterinary Parasitology 86: 113–118.
 49. González AE, Gavidia CM, Falcon N, Evans C, Bernal T, Lopez-Urbina T, García HH, Gilman RH. 1999b. Porcine cysticercosis: Epidemiology, diagnosis and treatment. In: García HH, Martínez SM (Eds). *Taenia solium* Taeniasis/Cysticercosis. Lima. Editora Universo. p97-119.
 50. González AE, Falcón N, Gavidia CM, Bernal T, Romero M, García HH, Gilman RH, Tsang VCW. 1997. Treatment of Porcine Cysticercosis with Oxfendazole: A dose-response trial. The Veterinary Record. 141(16): 420-422.
 51. González AE, García HH, Gilman RH, Gavidia CM, Tsang VC, Bernal T, *et al.* 1996. Effective, single-dose treatment of porcine cysticercosis with oxfendazole.

- Am J Trop Med Hyg 54(4): 391-394.
52. González AE, García HH, Gilman RH, López T, Gavidia CM, McDonald J, *et al.* 1995. Treatment of Porcine Cysticercosis with Albendazole. Am J Trop Med Hyg 53: 571-584.
 53. González AE, Cama V, Gilman RH, Tsang VCW, Pilcher JB, Chavera A, Castro M, Montenegro T, Verástegui M, Miranda E, Bazalar H. 1990. Prevalence and comparison of serologic assays necropsy and tongue examination for the diagnosis of Porcine Cysticercosis in Perú. Am J Trop Med Hyg 43(2): 194-199.
 54. González LM, Bonay P, Benitez L, Ferrer E, Harrison LJ, Parkhouse RM, Garate T, 2007. Molecular and functional characterization of a *Taenia* adhesion gene family (TAF) encoding potential protective antigens of *Taenia saginata* oncospheres. Parasitol Res 100: 519-528.
 55. Hiepe TH, Lucius R, Gottstein B. 2011. Parasitología General: Con principios de inmunología, diagnóstico y lucha antiparasitaria. Zaragoza: Editorial Acribia. p151-154.
 56. Jayashi CM, Kyngdon CT, Gauci CG, Gonzalez AE, Lightowlers MW. 2012. Successful immunization of naturally reared pigs against porcine cysticercosis with a recombinant oncosphere antigen vaccine. Vet Parasitol 188(3-4): 261–267.
 57. Kalinna B, McManus DP. 1993. An IgG (Fc gamma)-binding protein of *Taenia crassiceps* (Cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with Schistosoma paramyosine. Parasitology 106: 289-296.
 58. Kensil CR. 1996. Saponins as vaccine adjuvants. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 13: 1-55.
 59. Lescano AG, García HH, Gilman RH, Guezala MC, Tsang VCW, Gavidia CM, Rodríguez S, Moulton LH, Green JA, González AE and The Cysticercosis Working Group in Perú. 2007. Swine Cysticercosis hotspots surrounding *Taenia solium* tapeworm carriers. Am J Trop Med Hyg 76(2): 376-383.
 60. Lightowlers MW, Donadeu M. 2017. Designing a minimal intervention strategy to control *Taenia solium*. Trends in Parasitology 33(6): 426–434.

61. Lightowlers MW, García HH, Gauci CG, Donadeu M, Abela-Ridder B. 2016. Monitoring the outcomes of interventions against *Taenia solium*: Options and suggestions. *Parasite Immunol* 38(3): 158-169.
62. Lightowlers MW. 2010. Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: A role for vaccination of pigs. *International Journal for Parasitology* 40(10): 1183–1192.
63. Lightowlers MW. 2006. Cestode vaccines: origins, current status and future prospects. *Parasitology* 133: 27-42.
64. Lightowlers MW. 2003. Review Article: Vaccines for prevention of cysticercosis. *Acta Tropica* 87: 129-135.
65. Lightowlers MW, Gauci CG, Chow C, Drew DR, Gauci SM, Heath DD, Jackson DC, Dadley-Moor DL, Read AJ. 2003b. Molecular and genetic characterisation of the host-protective oncosphere antigens of taeniid cestode parasites. *Int J Parasitol* 33: 1207-1217.
66. Lightowlers MW, Lawrence CG, Gauci CG. 1996. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunol* 18: 457-462.
67. Mandujano A, Vela M, Alcántara P, *et al.* 1990. Presence of a receptor for the Fc fraction of IgG in *Taenia solium* (Abstract). *Bulletin de la Societie Francaise Parasitologie* 8(1): 578.
68. Martínez-Ocaña J, Romero-Valdovinos M, De Kaminsky RG, Maravilla P, Flisser A. 2011. Immunolocalization of TSOL18 and TSOL45-1^a, the successful protective peptides against porcine cysticercosis, in *Taenia solium* oncospheres. *Parasites & Vectors* 4: 36.
69. Mena C, González AE, Falcon N, Bernal T, Ayvar V. 2004. Incidencia de cisticercosis porcina en el distrito de Matapalo, Tumbes. *Rev Inv Vet Peru* 15(1): 63-69.
70. Molinari JL, Tato P, Lara-Aguilera R, White AC Jr. *J Parasitol*. 1993. Effects of serum from neurocysticercosis patients on the structure and viability of *Taenia solium* oncospheres. *J parasitol* 79(1): 124-127.
71. Morseth DJ. 1966. Chemical composition of embryonic blocks of *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis* and *Taenia pisiformis* eggs. *Experimental Parasitology* 18: 347-354.

72. Moyano LM, Saito M, Montano SM, Gonzalvez G, Olaya S, Ayvar V, González I, Larrauri L, Tsang VC, Llanos F, Rodríguez S, González AE, Gilman RH, García HH, Cysticercosis Working Group in Perú. 2014. Neurocysticercosis as a cause of epilepsy and seizures in two community-based studies in a cysticercosis-endemic region in Peru. *PLoS Negl Trop Dis* 8(2): 2692.
73. Murrell KD. 2005. Epidemiology of Taeniasis and Cysticercosis. In: Murrell KD (Ed). WHO/FAO/OIE Guidelines for the surveillance, prevention and control of Taeniasis/Cysticercosis. p28-43.
74. Náquira C. 1999. *Taenia solium*: Biological cycle and characteristics. In: García HH, Martínez SM (Eds). *Taenia solium* Taeniasis / Cysticercosis. 2da Edición. Lima. Editorial Universo. p7-14.
75. O'Neill SE, Moyano LM, Ayvar V, González G, Díaz A, Rodríguez Z, Wilkins PP, Tsang VC, Gilman RH, García HH, González AE, Cysticercosis Working Group in Perú. 2012. Geographic correlation between tapeworm carriers and heavily infected cysticercotic pigs. *PLoS Negl Trop Dis* 6(12): 1953.
76. [OMS] Organización Mundial de la Salud/[OPS] Organización Panamericana de la Salud. 2018. Teniasis y cisticercosis. [Internet]. [15 de Febrero del 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/>
77. [OMS] Organización Mundial de la Salud / [OPS] Organización Panamericana de la Salud/. 1993. Epidemiología y control de la Teniasis/Cisticercosis en América Latina. Versión 3.0. REF: PNSP/ p91-128.
78. Pal D, Carpio A, Sander J. 2000. Neurocysticercosis and epilepsy in developing countries. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68: 137–143.
79. Parija SC, Raman GA. 2011. Anti- *Taenia solium* larval stage IgG antibodies in patients with epileptic seizures. *Trop Parasitol* 1(1): 20-25.
80. Pathak KM, Gaur SN. 1990. Immunization of pigs with culture antigens of *Taenia solium*. *Vet Parasitol* 34: 353-356.
81. Pawlowski Z. 2002. *Taenia solium*: Basic Biology and Transmission. In: Singh G, Prabhakar S (Eds). *Taenia solium* Cysticercosis: From Basic to Clinical Science. CABI Publishing. p1-13.

82. Pinto PS, Vaz AJ, Germano PM, Nakamura PM. 2000. ELISA test for the diagnosis of cysticercosis in pigs using antigens of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. Rev Inst Med Trop S. Paulo 42(2): 71-79.
83. Plancarte A, Flisser A, Larralde C. 1983. Fibronectin-like properties in Antigen B from the Cysticercus of *Taenia solium*. Cytobios 36(142): 83-93.
84. Porter P, 1969. Porcine colostral IgA and IgM antibodies to *Escherichia coli* and their intestinal absorption by the neonatal piglet. Immunology 17: 617-626.
85. Quiroz H. 1999. Cestodos. En: Cordero Del Campillo M, Rojo Vásquez F (Eds). Parasitología Veterinaria. España. McGraw Hill Interamericana. p105-109.
86. Rajshekhar V, Joshi DD, Doanh NQ, Xiaonong Z. 2003. *Taenia solium* Taeniosis/Cysticercosis in Asia: Epidemiology, impact and issues. Acta Tropica 87(1): 53-60.
87. Ramos-Kuri M, Montoya M, Padilla A, Govezensky T, Díaz ML, Sciutto E, Sotelo J, Larralde C. 1992. Immunodiagnosis of neurocysticercosis. Disappointing performance of serology (enzyme-linked immunosorbent assay) in an unbiased sample of neurological patients. Arch Neurol 49(6): 633-636.
88. Ramos D. 1999. Seroprevalencia de cisticercosis porcina en las villas de Occollo y Anaccma – Provincia de Andahuaylas Departamento de Apurímac. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nac Mayor de San Marcos. p23.
89. Rodríguez-Canul, Fraser A, Allan JC, Domínguez-Alpizar JL, Arguez-Rodríguez F, Craig PS. 1999. Epidemiological study of *Taenia solium* Taeniosis/Cysticercosis in a rural village in Yucatán State, Mexico. Ann Trop Med Parasitol 93: 57-67.
90. Román G, Sotelo J, Del Brutto O, Flisser A, Dumas M, Wadia N, Botero D, Cruz M, García H, De Bittencourt, PRM, Trelles L, Arriagada C, Lorenzana P, Nash TE, Spina-Franca A. 2000. A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. Bulletin of World Health Organization 78: 399-406.
91. Sarti-Gutierrez EJ, Schantz PM, Lara-Aguilera R, Gómez H, Flisser A. 1988. *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis in a Mexican village. Trop Med Parasitol 39(3): 194-198.

92. Schantz PM. 2002. *Taenia solium* Cysticercosis: An overview of global distribution and transmission. In: Singh G, Prabhakar S (Eds). *Taenia solium* Cysticercosis: From Basic to Clinical Science. CABI Publishing. 63-70.
93. Sciutto E, Fragoso G, De Aluja AS, Hernández M, Rosas G, Larralde C. 2008. Vaccines against cysticercosis. *Curr Top Med Chem* 8: 415–423.
94. Sciutto E, Fragoso G, Manoutcharian K, Gevorkian G, Rosas-Salgado G, Hernández-González M, Herrera-Estrella L, Cabrera-Ponce J, López-Casillas F, González-Bonilla C, Santiago-Machuca A, Ruiz-Pérez F, Sánchez J, Goldbaum F, Aluja A, Larralde C. 2002. New approaches to improve a peptide vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis. *Arch Med Res* 33: 371-378.
95. Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Laclette JP, Sotelo J, Aluja A, Vargas L, Larralde C. 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: An ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and Infection* 2: 1875-1890.
96. Sciutto E, Martínez JJ, Villalobos NM, Hernández M, José MV, Beltrán C, Rodarte F, Flores I, Bobadilla JR, Fragoso G, Parkhouse ME, Harrison LJS, De Aluja AS. 1998. Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* Cysticercosis in rural pigs. *Veterinary Parasitology* 79: 299-313.
97. Sikasunge CS, Phiri IK, Phiri AM, Siziya S, Dorny P, Willingham AL. 2008. Prevalence of *Taenia solium* porcine cysticercosis in the Eastern, Southern and Western provinces of Zambia. *Vet Journal* 176(2): 240–244.
98. Smyth JD. 1994. *Introduction to Animal Parasitology*. 3rd Edition. Cambridge. Cambridge University Press. p277-387.
99. Soulsby E. 1987. *Parasitología y enfermedades parasitarias*. México. Nueva Editorial Interamericana. p823.
100. Sun HX, Xie Y, Ye YP. 2009. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine* 27: 1787-1796.
101. Tellez-Girón E, Ramos MC, Dufour L, Montante M, Tellez E Jr, Rodríguez J, Gómez F, Mireles E. 1984. Treatment of neurocysticercosis with flubendazole. *Am J Trop Med Hyg*, 33(4): 626-631.

102. Tsai IJ, Zarowiecki M, Berriman M. 2013. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 49(6): 57-63.
103. Tsang VC, Brand J, Boyer AE. 1989. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis* 24: 101-115.
104. Ugolev AM. 1965. Membrane (contact) digestion. *Physiol Rev* 45: 555-595.
105. Verástegui M, Gilman RH, Arana Y, Barber D, Velásquez J, Farfán M, Chile N, Kosek JC, Kosek M, García HH, González A, Cysticercosis Working Group in Perú. 2007. *Taenia solium* oncosphere adhesion to intestinal epithelial and Chinese hamster ovary cells in vitro. *Infection and Immunity* 75(11): 5158-5166.
106. Wardle RA, McLeod JA, Radinovsky S. 1974. *Advances in the Zoology of Tapeworms 1950-1970*. University of Minnesota Press, Minneapolis. p10-22.
107. White AC. 1997. Neurocysticercosis: A major cause of neurological disease worldwide. *Clin Infect Dis* 24: 101-115.
108. Wilms K, Arcos L. 1977. *Taenia solium*: Host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural Immuno-Enzyme technique. *Experimental Parasitology* 43: 396-401.
109. Xuepeng C, Gailing Y, Yadong Z, Xuenong L, Shaohua Z, Juntao D, Zhizhong J, Chengping L. 2008. Effective production and purification of the glycosylated TSOL18 antigen, which is protective against porcine cysticercosis. *Infection and Immunity* 76(2): 767-770.
110. Zoli A, Shey – Njila O, Assana E, Nguekam JP, Dorny P, Brandt J, Geerts S. 2003. Regional status, epidemiology and impact of *Taenia solium* Cysticercosis in Western and Central Africa. *Acta Tropica* 87: 35-42.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: CONSTANCIA DEL COMITÉ DE ÉTICA Y BIENESTAR ANIMAL



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Vicerrectorado de Investigación
Dirección Universitaria de Investigación,
Ciencia y Tecnología - DUICT

CONSTANCIA

El que suscribe, Presidente del Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales - CIEA de la Universidad Peruana Cayetano Heredia certifica, que el Protocolo de Investigación, versión de fecha 16 de marzo 2012 titulado: "Estudios de Eficacia, Seguridad e Inmunidad Materna para la vacuna Tsol18 contra Cisticercosis Porcina", código de inscripción 59709, presentado por el Investigador Principal Dr. Héctor Hugo García, ha sido **REVISADO Y APROBADO** en reunión del CIEA de fecha 19 de marzo del 2012. No habiéndose encontrado objeciones de acuerdo a los estándares propuestos por la Universidad.

Esta aprobación tendrá vigencia hasta el 21 de marzo del 2013. Los trámites para su renovación deberán iniciarse por los menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 22 de marzo de 2012

Msc. León Villegas Vilches
Presidente
Comité Institucional de Ética
Para el Uso de Animales - CIEA



/Soleidad

ANEXO 2: PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA DE ELISA INDIRECTO

1. Se sensibiliza una placa NUNC MAXISORP con 0.3ug/ml de antígenos TSO118 diluido en 10ml de buffer bicarbonato (Mezclado como mínimo por 15 minutos). Se coloca 100ul de la mezcla en cada pozo de placa.
2. La placa es colocada en un agitador a 37°C durante una hora, luego se almacena a 4°C por doce horas.
3. Luego se realiza el lavado de las placas con PBS-Tween 0.05%, este procedimiento se realiza tres veces. Luego se procede al secado de las placas.
4. Se agrega 150ul del Buffer Bloqueante (PBS- Tween 0.05%- NBCS 2%) en cada pozo. Fueron incubados a 37°C durante una hora mientras son agitadas.
5. El contenido de las placas fue eliminado y no se realizó ningún lavado de los mismos.
6. Se colocaron 100ul de la muestra de suero a evaluar diluido a 1/200 en PBS-Tween 0.05% - NBCS 5%. Se duplicó cada muestra y fue incubado a 37°C por una hora en agitación.
7. Se realizaron cinco lavados con PBS-Tween 0.05% y secados sobre papel toalla.
8. Se preparó una dilución de 1/8000 del conjugado (cabra anti-porcina IgG – KPL) en una solución de PBS- Tween 0.05% y NBCS 5%. 100ul de este conjugado se agregaron a los pocillos y se incubaron a 37°C por una hora en agitación.
9. Se realizaron cinco lavados con PBS-Tween 0.05% y secados sobre papel toalla.
10. Se agregó 100ul de una solución sustrato (1 pastilla de OPD 10mg – Sigma disuelta en 10ml de buffer citrato). La placa fue colocada en reposo en un lugar oscuro a 30°C durante treinta minutos.
11. Se detuvo la reacción al añadir 50ul de H₂SO₄2N
12. La lectura se va realizar utilizando un espectrofotómetro a 450nm.

**ANEXO 3: NUMERO DE QUISTES SANOS, DEGENERADOS Y TOTALES
(*Cysticercus cellulosae*) ENCONTRADOS EN CADA INDIVIDUO
DURANTE LA EVALUACION DE LA CANAL**

ID	T	FE_NECROPSIA	SEGMENTOS DE LA CANAL												NUMERO DE QUISTES		
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	QS	QD	QT
30	1	04/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	1	05/09/2012	2	5	7	5	5	1	1	1	0	4	1	0	3	32	35
01	1	11/09/2012	5	1	6	6	2	2	1	7	0	4	8	3	0	45	45
26	1	05/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	1	05/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	1	03/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	1	04/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	1	05/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	1	13/09/2012	3	2	12	2	0	4	4	3	0	3	1	1	0	35	35
16	1	13/09/2012	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
32	2	11/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	2	03/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
06	2	11/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	2	12/09/2012	6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	7	7
15	2	04/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	2	04/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	2	05/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	2	05/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	2	13/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	2	12/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	3	05/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	3	05/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
04	3	11/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	3	13/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	3	05/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	3	04/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	3	13/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	3	04/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
05	3	12/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
09	4	12/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	2
37	4	04/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
02	4	11/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	4	04/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	4	13/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	4	04/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
03	4	12/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	4	05/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	4	12/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	4	13/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
07	5	11/09/2012	0	2	0	0	0	1	0	5	0	0	0	0	0	8	8
20	5	13/09/2012	1	1	1	2	2	0	1	4	0	1	0	2	0	15	15
18	5	12/09/2012	4	3	4	5	3	2	5	8	0	1	1	2	0	38	38
40	5	03/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	5	12/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1

12	5	12/09/2012	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
21	5	13/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	5	04/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	5	11/09/2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
08	5	12/09/2012	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3

Leyenda:

ID : Número de Individuo
T : Grupo de Tratamiento
A : Pierna izquierda
B : Pierna derecha
C : Brazo izquierdo
D : Brazo derecho
E : Costado izquierdo
F : Costado derecho
G : Cuello - Columna
H : Sacro
I : Cerebro
J : Corazón
K : Lengua
L : Cabeza
QS : Quistes sanos
QD : Quistes degenerados
QT : Quistes totales

ANEXO 4: VALORES DE PP+ PARA CADA INDIVIDUO POR DÍA DE SANGRADO

ID	T	-5d_PP	9d_PP	23d_PP	36d_PP	50d_PP	64d_PP	78d_PP	92d_PP	107d_PP
01	1	9.024	7.710	7.643	11.279	16.599	18.552	17.273	16.364	12.593
16	1	8.152	6.159	9.873	18.524	20.154	33.560	23.958	21.467	15.625
25	1	6.235	6.157	5.765	20.706	20.078	19.922	17.922	15.176	14.078
26	1	6.235	7.059	6.431	27.804	59.843	56.000	86.706	100.353	107.333
30	1	6.042	7.400	6.517	11.066	24.847	23.218	19.009	19.077	17.651
33	1	5.431	7.933	7.486	10.199	16.037	17.926	29.087	52.129	51.339
42	1	8.186	8.333	8.235	37.64706	95.980	102.892	78.431	77.647	70.931
44	1	7.380	9.805	7.064	14.707	22.140	22.509	17.870	12.968	12.652
46	1	8.540	9.067	11.017	16.763	34.844	27.412	27.517	24.671	30.733
50	1	6.406	6.189	6.243	42.834	39.414	53.529	71.336	43.214	36.374
06	2	6.567	6.090	9.493	32.418	26.388	27.761	22.687	23.522	23.701
14	2	6.513	9.091	11.296	94.742	75.950	59.294	42.639	37.319	27.310
15	2	10.870	11.821	12.545	93.931	82.609	55.797	49.275	42.663	33.333
22	2	5.768	9.258	27.957	157.678	131.374	119.177	120.573	123.953	108.193
27	2	7.647	10.039	14.510	97.686	82.549	60.431	52.353	44.392	32.667
32	2	5.092	35.574	24.779	110.523	93.279	91.378	78.072	46.436	52.885
35	2	10.714	13.118	16.552	97.184	73.214	66.690	61.676	66.690	45.742
38	2	29.015	27.197	24.773	169.167	179.697	103.939	80.455	90.076	60.606
48	2	7.112	14.821	26.384	141.64	122.584	118.024	106.135	84.419	69.653
49	2	6.298	7.383	12.812	113.518	98.046	84.636	65.309	68.458	64.604
04	3	6.667	15.084	16.801	129.596	137.475	113.670	93.973	74.882	56.397
05	3	4.265	21.471	36.029	120.9314	97.990	112.353	93.333	85.931	71.765
13	3	6.411	36.058	20.692	138.636	120.590	117.503	103.799	99.830	83.989
19	3	7.696	15.539	14.755	136.9118	123.480	107.157	96.765	86.176	67.304
29	3	8.011	12.967	12.763	116.836	108.622	110.659	92.872	78.344	66.531
31	3	7.400	13.374	38.697	147.454	132.383	107.400	94.840	59.946	69.993
36	3	5.426	27.953	21.085	127.404	110.440	97.115	90.385	70.055	49.176
43	3	8.276	20.822	22.667	132.736	118.028	102.319	89.721	78.861	67.633
45	3	9.383	15.129	18.503	114.338	105.482	87.612	78.756	66.579	63.679
02	4	5.892	7.811	23.737	128.35	107.441	104.108	88.687	75.320	58.148
03	4	8.721	13.704	42.862	140.37	136.498	141.886	127.879	134.680	125.623
09	4	11.910	11.104	16.478	84.716	71.731	67.284	71.045	69.910	82.776
11	4	9.803	12.042	20.692	72.185	56.445	46.710	34.159	28.901	28.664
17	4	7.156	6.612	10.236	58.288	58.877	41.576	33.514	25.091	19.429
34	4	7.418	12.637	33.310	158.997	155.288	145.879	136.951	137.500	124.863
37	4	5.098	16.765	19.461	115.5392	101.127	83.725	69.412	60.882	46.569
39	4	10.758	17.727	32.576	87.955	89.924	62.424	35.909	32.197	32.955
41	4	16.970	18.636	22.273	29.167	45.152	44.924	44.773	38.788	32.576
47	4	6.895	20.955	28.502	117.264	114.441	126.384	131.216	125.244	108.306
07	5	12.388	11.642	9.881	12.627	24.060	28.328	20.955	20.328	19.522
08	5	8.209	6.896	8.537	7.045	7.851	7.642	7.433	7.075	7.313
10	5	7.881	8.175	8.243	10.516	11.872	13.060	13.501	15.265	12.856
12	5	11.194	10.651	8.955	10.991	11.092	10.685	9.091	9.328	9.701
18	5	6.341	7.065	6.295	9.284	7.337	8.650	8.152	9.194	9.058
20	5	6.723	6.686	8.266	9.295	9.001	7.201	7.752	8.119	10.066
21	5	7.127	7.090	6.760	7.752	8.339	8.450	7.348	6.650	7.421
23	5	6.870	6.062	8.082	9.331	16.679	11.132	12.234	13.556	17.083

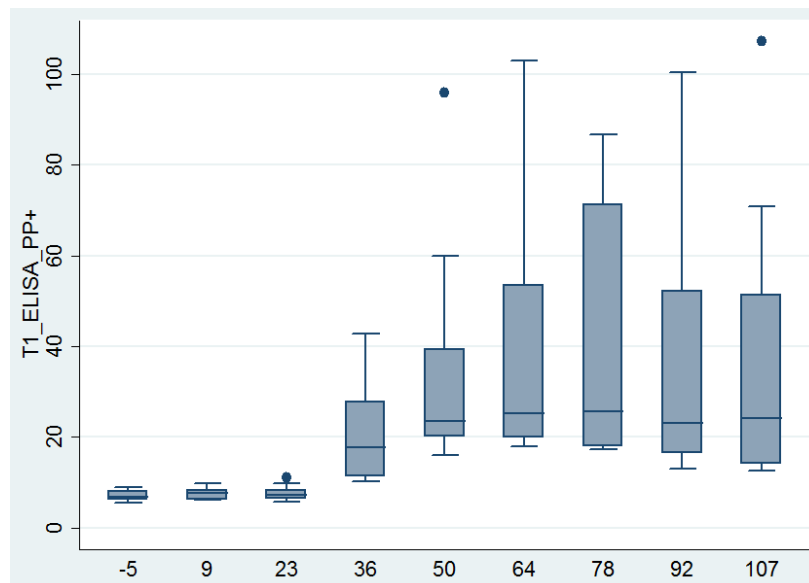
24	5	8.157	8.235	9.490	8.392	9.451	9.137	10.314	10.235	9.451
40	5	20.227	26.970	11.439	19.242	19.015	20.682	17.424	16.591	18.561

Leyenda:

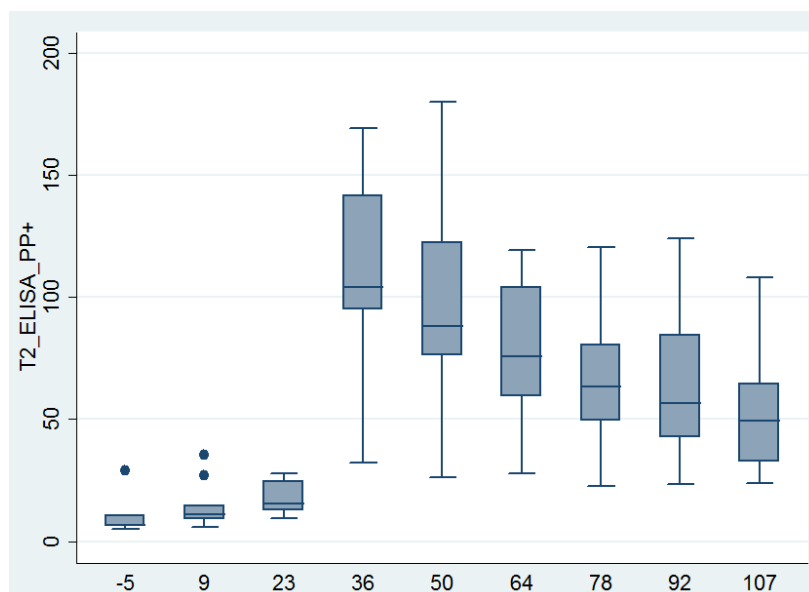
- 5d_PP : Valores PP+ Para el 1° sangrado, realizado 5 días antes del día 0.*
- 9d_PP : Valores PP+ Para el 2° sangrado, realizado 9 días después del día 0.*
- 23d_PP : Valores PP+ Para el 3° sangrado, realizado 23 días después del día 0.*
- 36d_PP : Valores PP+ Para el 4° sangrado, realizado 36 días después del día 0.*
- 50d_PP : Valores PP+ Para el 5° sangrado, realizado 50 días después del día 0.*
- 64d_PP : Valores PP+ Para el 6° sangrado, realizado 64 días después del día 0.*
- 78d_PP : Valores PP+ Para el 7° sangrado, realizado 78 días después del día 0.*
- 92d_PP : Valores PP+ Para el 8° sangrado, realizado 92 días después del día 0.*
- 107d_PP : Valores PP+ Para el 9° sangrado, realizado 107 días después del día 0.*

**Se considera el día 0 al día de la aplicación de la primera dosis de vacuna.*

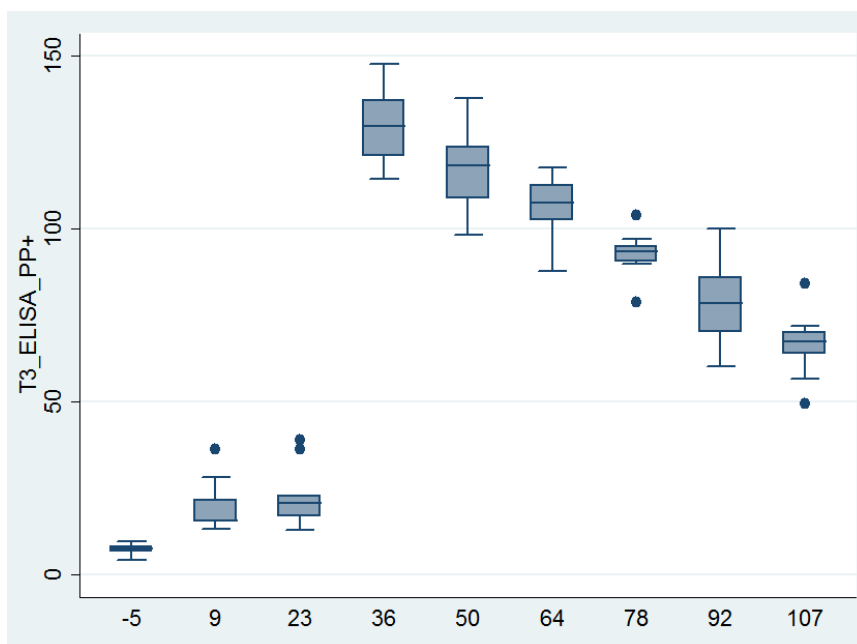
ANEXO 5: GRÁFICAS BOX PLOT PARA EVALUAR LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS A TRAVÉS DEL TIEMPO DE ESTUDIO EN CADA TRATAMIENTO



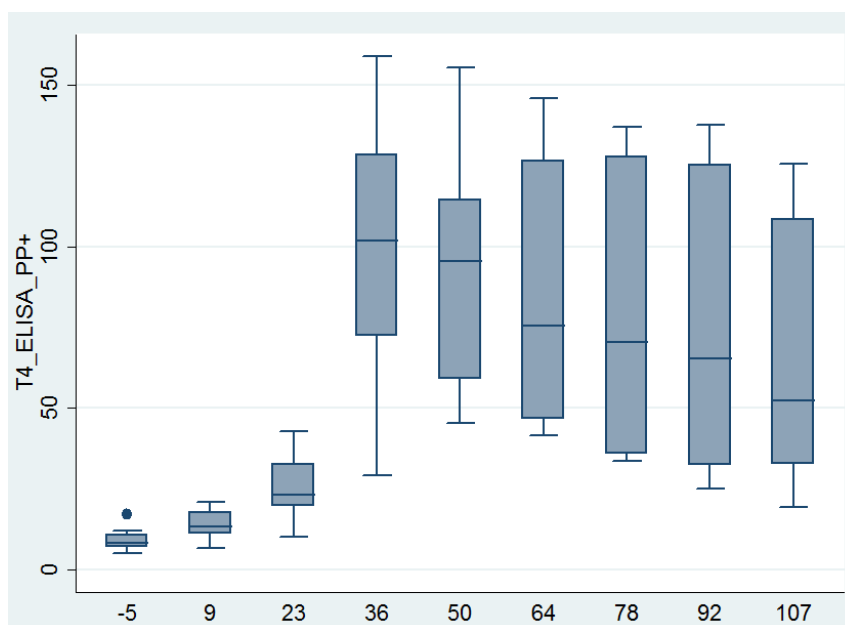
Resultados de PP+ en el Grupo T1 (*ILTSOL18+ISA206V- 1Dosis*) durante los días de sangrado. En este grupo la dosis vacunal se administró al día 23 del estudio. El desafío se realizó al día 37 para todos los grupos de tratamiento. Se considera el día 0 al día de la aplicación de la primera dosis de vacuna. Gráfico obtenido mediante el programa estadístico STATA 12.0 (Stata Corp).



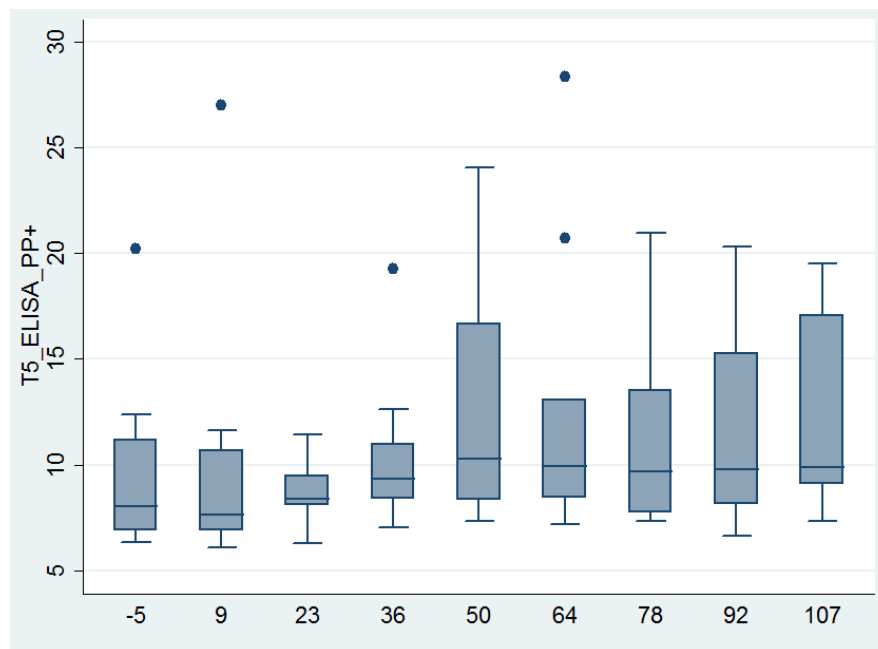
Resultados de PP+ en el Grupo T2 (*UMTSOL18+Quila – 2 Dosis*) durante los días de sangrado. En este grupo las dosis vacunales se administraron al 0 y al día 23 del estudio. El desafío se realizó al día 37 para todos los grupos de tratamiento. Gráfico obtenido mediante el programa estadístico STATA 12.0 (Stata Corp).



Resultados de PP+ en el Grupo T3 (*ILTSOL18+QuilA – 2 Dosis*) durante los días de sangrado. En este grupo las dosis vacunales se administraron al 0 y al día 23 del estudio. El desafío se realizó al día 37 para todos los grupos de tratamiento. Gráfico obtenido mediante el programa estadístico STATA 12.0 (Stata Corp).



Resultados de PP+ en el Grupo T4 (*ILTSOL18+ISA206V – 2Dosis*) durante los días de sangrado. En este grupo las dosis vacunales se administraron al 0 y al día 23 del estudio. El desafío se realizó al día 37 para todos los grupos de tratamiento. Gráfico obtenido mediante el programa estadístico STATA 12.0 (Stata Corp).



Resultados de PP+ en el Grupo T5 o Control durante los días de sangrado. En este grupo se administró suero fisiológico en las fechas de inmunización. El desafío se realizó al día 37 para todos los grupos de tratamiento. Gráfico obtenido mediante el programa estadístico STATA 12.0 (Stata Corp).